

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Marina Andreia Santos Mendes Pires**

**Miocardiomatia Hipertrófica: novas  
metodologias aplicadas ao diagnóstico  
genético**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes (FCT/UNL)

**Co-orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Doutora Susana Isabel Rodrigues dos Santos (Instituto Superior Técnico)

**Monte da Caparica**

**2011**



# **Miocardiolpatia Hipertrófica: novas metodologias aplicadas ao diagnóstico genético**

Copyright Marina Pires, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde, assassinada pela experiência.

(Albert Einstein)



## AGRADECIMENTOS

Depois de um ano intenso e com muito trabalho, há alguns agradecimentos que gostaria de fazer.

A nível institucional gostaria de agradecer à Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias a disponibilização das infraestruturas e dos recursos necessários à realização deste trabalho.

Às minhas orientadoras, Prof. Dra. Alexandra Fernandes e Prof. Dra. Susana Santos, agradeço o voto de confiança que depositaram no meu trabalho, bem como o apoio prestado e a disponibilidade que sempre demonstraram para discutir ideias.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, na pessoa da Dra. Isabel Carreira, agradeço a colaboração prestada. À Ana Santos, agradeço a realização das sequenciações das amostras enviadas.

À Ana Silva, Ana Sousa, Daniel, Helena, Kelly, Leonor, Luís e Vanda, agradeço a forma como me acolheram no grupo de investigação e o companheirismo que sempre demonstraram. Mesmo quando o trabalho não corria da melhor forma, sempre tiveram uma palavra de incentivo.

À Ana Luísa, à Sara e à Sofia agradeço as longas conversas, em que sabemos as novidades, partilhamos rumos e discutimos ideias. Obrigada meninas! Ao Diogo, ao Faia, ao Falcato, ao Ricardo e ao Sérgio agradeço todos os momentos de risada e de descontração, todos os ótimos momentos partilhados ao longo dos anos. Obrigada rapazes por estarem sempre por perto, por me animarem e por me ajudarem a manter alguma sanidade! Sem vocês as coisas seriam bem mais difíceis! Ao Nuno e ao Prof. José agradeço a paciência por me ouvirem e as sugestões/conselhos que sempre me deram e que tantas vezes me levaram a ver as situações de outra forma. Ao Jorge agradeço a amizade e a boa disposição. És a pessoa que me conhece há mais tempo e, apesar das poucas vezes em que estamos juntos, a proximidade que temos mantém-se intocada. Gostaria de agradecer a todos os amigos e amigas que não nomeei, mas que foram estando presentes ao longo de todo o percurso académico e pessoal. Todos contribuíram para que me tornasse na pessoa que sou hoje.

Em último lugar, mas em primeiro lugar no coração, gostaria de agradecer à minha família, especialmente aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, por me apoiarem incondicionalmente, por me darem todas as condições para que alcance os meus objectivos, enfim...pelo amor infinito que me têm e que sabem que é mútuo. Muito Obrigada. Sem vocês ao meu lado teria sido impossível chegar até aqui.



## RESUMO

A Miocardiopatia Hipertrófica (MH) é uma doença cardíaca genética com um padrão de transmissão autossómico dominante, que afecta 1 em cada 500 indivíduos na população em geral, sendo a principal causa de morte súbita em jovens e atletas. A MH caracteriza-se pelo espessamento do septo interventricular e aumento do átrio, associado a desorganização dos cardiomiócitos e fibrose intersticial.

A MH é causada por mutações em genes que codificam para proteínas sarcoméricas (por ex: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2*, *MYL3*, *TTN*, *TPM1*, *ACTC1* e *MYH6*) e não sarcoméricas (por ex: *TCAP* e *CSRP3*). O diagnóstico clínico de MH é realizado através de electrocardiograma e ecocardiografia bidimensional. O diagnóstico genético, actualmente, baseia-se na pesquisa de mutações por sequenciação automática dos 5 principais genes associados a MH. Contudo, são já conhecidas mutações em mais de 30 genes, que não são analisados por sequenciação automática devido ao elevado custo e tempo de processamento. O objectivo deste trabalho foi contribuir para a optimização do diagnóstico da MH pelo aperfeiçoamento de duas tecnologias analíticas de larga escala: a Genotipagem por Espectrometria de Massa (iPLEX *MassArray*) para detecção de mutações conhecidas, e a Desnaturação de Alta Resolução (HRM) para pesquisa de novas mutações, ambas utilizadas na caracterização de 37 doentes Portugueses com MH.

A análise realizada permitiu detectar alterações em 29 indivíduos, encontrando-se confirmadas por sequenciação 15 alterações, das quais cinco no gene *MYH7*, em que duas são novas (c.2585C>T; p.Ala862Val e c.1252 C>A;p.Gln418Lys), duas alterações no gene *MYBPC3*, uma das quais é nova (c.2470 C>A;p.Leu824Met), sete alterações no gene *TNNT2*, duas das quais são novas e encontram-se em regiões intrónicas (c.801+11A>G e c.600+65T>A) e uma nova alteração no gene *TNNI3* (c.521 A>T;p.Lys174Met).

Espera-se com este trabalho contribuir para um diagnóstico genético da MH rápido, económico, que permita a detecção precoce de casos severos da doença.

**Palavras-chave:** Miocardiopatia hipertrófica, morte súbita, diagnóstico genético, iPLEX *MassArray*, Desnaturação de Alta Resolução.





## ABSTRACT

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM), a cardiac genetic disease that presents an autosomal dominant transmission pattern affecting 1:500 individuals in the general population, is the main cause of sudden cardiac death in young people and athletes. Morphologic features of HCM include interventricular septum thickening and atrial enlargement, associated to myocyte disarray and interstitial fibrosis.

HCM is caused by mutations in genes encoding sarcomeric proteins (eg. *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2*, *MYL3*, *TTN*, *TPM1*, *ACTC1* and *MYH6*) and non sarcomeric proteins (eg. *TCAP* and *CSRP3*). Clinical diagnosis of HCM is established with electrocardiogram and bi-dimensional echocardiography. In Portugal, genetic diagnosis is accomplished using automated sequencing (AS) to search for mutations in the 5 most commonly associated HCM genes. However, more than 30 genes have been associated with HCM, which are not analyzed by AS due to the elevated cost and processing time. The aim of this study was to contribute to the optimization of HCM genetic diagnosis by using two large scale analytical technologies: Mass Spectrometry Genotyping (iPLEX *MassArray*) and High Resolution Melting (HRM) in order to characterized 37 Portuguese HCM patients.

This work allowed us to identify genetic alterations in 29 individuals, being 15 of those already confirmed by AS. We were able to find five alterations in *MYH7* gene, two of which are novel alterations (c.2585C>T; p.Ala862Val and c.1252 C>A; p.Gln418Lys), two alterations in *MYBPC3* gene, one of these is new (c.2470 C>A; p.Leu824Met), seven alterations in *TNNT2* gene, two of them are novel and located in intronic regions (c.801+11A>G and c.600+65T>A) and a new alteration in *TNNI3* gene (c.521 A>T; p.Lys174Met).

The purpose of this study was to contribute to a faster and less expensive HCM genetic diagnosis that will contribute to the early detection of severe cases of the disease.

**Keywords:** Hypertrophic Cardiomyopathy, Sudden Death, Genetic Diagnosis, iPLEX *MassArray*, High Resolution Melting.



## ABREVIATURAS

A - Adenina

a.a. – aminoácido

*ACE1* – gene que codifica para a enzima conversora da angiotensina 1, do inglês *Angiotensin Converting Enzyme 1*

*ACE2* – gene que codifica para a enzima conversora da angiotensina 2, do inglês *Angiotensin Converting Enzyme 2*

*ACTA1* - gene que codifica para a actina  $\alpha$ -1 do músculo esquelético

*ACTC1* – gene que codifica para a actina cardíaca

AMP – Adenosina monofosfato

Ala – Alanina

Arg - Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Aspartato

ATP – Adenosina trifosfato

C – Citosina

*CASQ2* – gene que codifica para a calsequestrina 2 do músculo cardíaco

*CAV3* – gene que codifica para a caveolina 3

*COX15* – gene que codifica para o citocromo C oxidase

*CSRP3* – gene que codifica para a proteína LIM do músculo cardíaco

Cys – Cisteína

*DES* – gene que codifica para a proteína desmina

DGGE – Electroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electroforesis*

dHPLC - Cromatografia líquida desnaturante de alta resolução, do inglês *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxiribonucleic Acid*

dNDPs – desoxirribonucleósidos di-fosfato

dNTPs – desoxirribonucleósidos tri-fosfato

ddNTPs – didesoxirribonucleósidos

EUA – Estados Unidos da América

*FXN* – gene que codifica para a frataxina

G - Guanina

Gln – Glutamina

Glu – Glutamato

Gly – Glicina

h - hora

His – Histidina

HRM – Desnaturação de alta resolução, do inglês *High Resolution Melting*

Ile – Isoleucina

*JPH2* – gene que codifica para a junctofilina-2

K<sup>+</sup> - ião potássio

kDa – Quilo daltons

*LAMP2* – gene que codifica para a proteína 2 associada à membrana dos lisossomas.

Leu – Leucina

Lys – Lisina

MALDI-TOF – Matriz sujeita a laser de dessorção/ionização – tempo de voo, do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*

Met – Metionina

Mg<sup>2+</sup> - ião magnésio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

MH – Miocardiopatia Hipertrófica

Min – Minutos

mM – Milimolar

m/v – massa/volume

*MTCYB* – gene mitocondrial que codifica para a citocromo B oxidase

*MTTG* – gene que codifica para o RNA de transferência da glicina

*MTTI* – gene que codifica para o RNA de transferência da isoleucina

*MYBPC3* – gene que codifica para a proteína C de ligação à miosina cardíaca

*MYH6* – gene que codifica para a cadeia pesada  $\alpha$  da miosina

*MYH7* – gene que codifica para a cadeia pesada  $\beta$  da miosina

*MYL2* – gene que codifica para a cadeia leve regulatória da miosina

*MYL3* – gene que codifica para a cadeia leve essencial da miosina

*MYLK2* – gene que codifica para a cinase 2 da cadeia leve da miosina, no músculo esquelético

*MYO6* – gene que codifica para miosina 6

*MYOZ2* – gene que codifica para a miozenina 2

NAC - N-acetilcisteína

Na<sup>+</sup> - íão sódio

ng – Nanograma

OBSCN – gene que codifica para a obscurina

pb – Pares de bases

PCR – Reacção em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Phe – Fenilalanina

PKA – Proteína Cinase A

PLN – gene que codifica para a proteína fosfolamban

PRKAG2 – gene que codifica para a subunidade γ2 da AMP cinase

Pro – Prolina

RAAS – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, do inglês *Renin-Angiotensin-Aldosterone-System*

RAF1 – gene que codifica para a proteína cinase serina/treonina, homólogo 1

SAP – fosfatase alcalina de camarão, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SBE – extensão de uma única base, do inglês *Single Base Extension*

seg – Segundos

Ser – Serina

SLC25A4 – gene que codifica para o transportador mitocondrial, translocador de adenina, família 25, membro 4

SNP - Polimorfismo de um único nucleótido, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

SSCP – Polimorfismo de conformação de cadeia simples, do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*

T - Timina

Ta – Temperatura de emparelhamento, do inglês *annealing*

TCAP – gene que codifica para a teletonina

Thr – Treonina

Tm – Temperatura de desnaturação, do inglês *melting*

Trp – Triptofano

TNNC1 – gene que codifica para a troponina cardíaca C

TNNI3 – gene que codifica para a troponina cardíaca I

TNNT2 – gene que codifica para a troponina cardíaca T

TPM1 – gene que codifica para a α-tropomiosina

TTN – gene que codifica para a titina

Val – Valina

V – Volt

VCL – gene que codifica para vinculina

$\mu$ L – Microlitro

$\mu$ M – Micromolar

## Índice geral

	Página
Índice de tabelas	xv
Índice de figuras	xvi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia da MH	1
1.2 Fenótipo da MH	1
1.2.1 Características morfológicas da MH	2
1.2.2 Diagnóstico clínico da MH	3
1.2.3 Estratégias de tratamento	4
1.3 Genética da MH	4
1.3.1 Sarcómero	5
1.3.1.1 Mecanismo de contracção muscular	5
1.4 Mutações causadoras de MH	6
1.4.1 Mutações em genes que codificam para proteínas dos filamentos grossos	7
1.4.1.1 Miosina	7
1.4.1.1.1 Mutações na cadeia pesada $\beta$ da miosina ( <i>MYH7</i> )	8
1.4.1.1.2 Mutações na cadeia pesada $\alpha$ da miosina ( <i>MYH6</i> )	9
1.4.1.1.3 Mutações na cadeia leve essencial da miosina ( <i>MYL3</i> )	9
1.4.1.1.4 Mutações na cadeia leve regulatória da miosina ( <i>MYL2</i> )	9
1.4.1.2 Proteína C de ligação à miosina ( <i>MYBPC3</i> )	9
1.4.2 Mutações em genes que codificam para proteínas dos filamentos finos	10
1.4.2.1 Troponina T cardíaca ( <i>TNNT2</i> )	10
1.4.2.2 Troponina I cardíaca ( <i>TNNI3</i> )	11
1.4.2.3 Troponina C cardíaca ( <i>TNNC1</i> )	11
1.4.2.4 $\alpha$ -Tropomiosina ( <i>TPM1</i> )	12
1.4.2.5 Actina cardíaca ( <i>ACTC1</i> )	12
1.4.3 Mutações no gene que codifica para a titina ( <i>TTN</i> )	12
1.4.4 Mutações em genes que codificam para as proteínas do disco Z (genes não sarcoméricos)	12
1.4.4.1 Teletonina ( <i>TCAP</i> )	13
1.4.4.2 Proteína LIM do músculo cardíaco ( <i>CSRP3</i> )	13
1.4.4.3 Miozenina 2 ( <i>MYOZ2</i> )	13
1.5 Outras mutações em genes não sarcoméricos	14
1.5.1 Fenocópias	14
1.5.2 Genes modificadores	15
1.6 Mutações Compostas	16
1.7 Diagnóstico Genético	16
1.8 <i>iPLEX MassArray</i>	17
1.9 Desnaturação de Alta Resolução (HRM)	20
1.10 Objectivos do trabalho	23
2- MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 Amostra populacional em estudo	25
2.2 Isolamento e quantificação de DNA de 1 mL de sangue total	25
2.3 Caracterização do polimorfismo de inserção/delecção no intrão 16 do gene <i>ACE1</i>	26

2.4 iPLEX <i>MassArray</i>	27
2.5 Desnaturalização de Alta Resolução (HRM)	29
2.6 Reacções de PCR, purificação dos respectivos produtos e sua sequenciação	30
3- RESULTADOS e DISCUSSÃO	33
3.1 Polimorfismo de inserção/delecção no intrão 16 do gene <i>ACE1</i>	33
3.2 Resultados de iPLEX <i>MassArray</i>	34
3.2.1 Alterações detectadas no gene <i>TNNT2</i>	35
3.2.2 Alteração detectada no gene <i>TNNI3</i>	37
3.2.3 Alterações detectadas no gene <i>MYH7</i>	39
3.2.4 Alteração detectada no gene <i>MYBPC3</i>	43
3.3 Resultados de HRM	46
3.3.1 Alterações detectadas no gene <i>TNNT2</i>	46
3.3.2 Alteração detectada no gene <i>TNNI3</i>	50
3.3.3 Alterações detectadas no gene <i>MYH7</i>	52
3.3.4 Alterações detectadas no gene <i>MYBPC3</i>	57
3.3.5 Alterações detectadas no gene <i>MYL2</i>	60
3.3.6 Alterações detectadas no gene <i>TCAP</i>	61
3.3.7 Alterações detectadas no gene <i>ACTC1</i>	62
4- CONCLUSÃO	63
5- BIBLIOGRAFIA	65
6- ANEXOS	73



## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.1:</b> Classificação estrutural das miocardiopatias primárias.	1
<b>Figura 1.2:</b> Aspecto macroscópico e microscópico de MH.	2
<b>Figura 1.3:</b> Representação esquemática da organização da fibra muscular.	5
<b>Figura 1.4:</b> Representação esquemática do processo de contracção.	6
<b>Figura 1.5:</b> Representação esquemática da estrutura parcial de um sarcómero.	7
<b>Figura 1.6:</b> Estrutura tridimensional da cadeia pesada $\beta$ da miosina.	8
<b>Figura 1.7:</b> Esquema de um ensaio de iPLEX.	18
<b>Figura 1.8:</b> Esquema da manipulação para adição de SAP.	19
<b>Figura 1.9:</b> Representação esquemática de dados do <i>chip</i> .	20
<b>Figura 1.10:</b> Esquema da formação de homo- e heteroduplexes.	21
<b>Figura 1.11:</b> Sequência de passos para obtenção dos perfis de desnaturação.	21
<b>Figura 1.12:</b> Exemplo da análise de um SNP.	22
<b>Figura 3.1:</b> Genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> , para a alteração c.779 A>G, p.Lys260Arg no gene <i>TNNT2</i> .	35
<b>Figura 3.2:</b> Caracterização da alteração c.779 A>G, p.Lys260Arg no exão 14 do gene <i>TNNT2</i> .	36
<b>Figura 3.3:</b> Estudo populacional efectuado para o exão 14 do gene <i>TNNT2</i> .	37
<b>Figura 3.4:</b> Genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> da amostra 33 para o exão 7 do gene <i>TNNI3</i> .	38
<b>Figura 3.5:</b> Caracterização da mutação c.521 A>T, p.Lys174Met, no exão 7 do gene <i>TNNI3</i> .	39
<b>Figura 3.6:</b> Caracterização da alteração c.958 G>A; p. Val320Met no exão 11 do gene <i>MYH7</i> .	40
<b>Figura 3.7:</b> Cromatograma com a sequenciação da amostra 158 para o exão 13 do gene <i>MYH7</i> .	40
<b>Figura 3.8:</b> Caracterização da mutação da amostra 158, no exão 13 do gene <i>MYH7</i> .	41
<b>Figura 3.9:</b> Perfis de desnaturação relativos ao estudo populacional efectuado para o exão 13 do gene <i>MYH7</i> .	42
<b>Figura 3.10:</b> Genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> , para a alteração da amostra 28 no exão 14 do gene <i>MYH7</i> .	42
<b>Figura 3.11:</b> Genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> , para a alteração da amostra 168 no gene <i>MYBPC3</i> .	43
<b>Figura 3.12:</b> Cromatograma com a sequenciação da amostra 168.	44
<b>Figura 3.13:</b> Caracterização da mutação c.2470 C>A; p.Leu824Met no exão 23 do gene <i>MYBPC3</i> .	44
<b>Figura 3.14:</b> Alterações detectadas no exão 14 do gene <i>TNNT2</i> .	46
<b>Figura 3.15:</b> Alteração detectada para a amostra 25 no gene <i>TNNT2</i> .	47
<b>Figura 3.16:</b> Alteração detectada para a amostra 34 no exão 14 do gene <i>TNNT2</i> .	48
<b>Figura 3.17:</b> Alteração detectada para a amostra 241 no intrão 12 do gene <i>TNNT2</i> .	48
<b>Figura 3.18:</b> Alteração detectada para a amostra 17, no exão 3 do gene <i>TNNT2</i> .	49
<b>Figura 3.19:</b> Alterações detectadas para as amostras 60 e 63 no exão 7 do gene <i>TNNI3</i> .	50
<b>Figura 3.20:</b> Alteração detectada para a amostra 33 no exão 7 do gene <i>TNNI3</i> .	51
<b>Figura 3.21:</b> Alteração detectada para as amostras 19 e 46 no exão 23 do gene <i>MYH7</i> .	52
<b>Figura 3.22:</b> Caracterização da alteração detectada na amostra 16, no exão 22 do gene	53

<i>MYH7.</i>	
<b>Figura 3.23:</b> Alteração detectada para a amostra 19, no exão 19 do gene <i>MYH7</i> .	54
<b>Figura 3.24:</b> Alteração detectada para a amostra 28, no exão 14 do gene <i>MYH7</i> .	54
<b>Figura 3.25:</b> Alterações detectadas no exão 13 do gene <i>MYH7</i> .	55
<b>Figura 3.26:</b> Alteração detectada para a amostra 19 no exão 11 do gene <i>MYH7</i> .	55
<b>Figura 3.27:</b> Alteração detectada para a amostra 14 no exão 7 do gene <i>MYH7</i> .	56
<b>Figura 3.28:</b> Alteração detectada para a amostra 71 no exão 5 do gene <i>MYH7</i> .	56
<b>Figura 3.29:</b> Alterações detectadas no exão 25 do gene <i>MYBPC3</i> .	57
<b>Figura 3.30:</b> Alteração detectada para a amostra 168 no exão 23 do gene <i>MYBPC3</i> .	58
<b>Figura 3.31:</b> Alteração detectada para a amostra 23 no exão 23 do gene <i>MYBPC3</i> .	58
<b>Figura 3.32:</b> Alterações detectadas para as amostras 34 e 35 no exão 17 do gene <i>MYBPC3</i> .	58
<b>Figura 3.33:</b> Alteração detectada para a amostra 15 no exão 16 do gene <i>MYBPC3</i> .	59
<b>Figura 3.34:</b> Alteração detectada para a amostra 71 no exão 7 do gene <i>MYL2</i> .	60
<b>Figura 3.35:</b> Alteração detectada para a amostra 71 no exão 1 do gene <i>TCAP</i> .	61

## Índice de tabelas

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.1</b> – Principais genes e proteínas associadas a MH.	14
<b>Tabela 2.1</b> – Amostra populacional em estudo e respectivo fenótipo.	25
<b>Tabela 2.2</b> – Composição da mistura de reacção de PCR para detecção do polimorfismo no intrão 16 do gene <i>ACE1</i> .	26
<b>Tabela 2.3:</b> Programa de PCR para a detecção do polimorfismo no intrão 16 do gene <i>ACE1</i> .	26
<b>Tabela 2.4</b> – Número de mutações analisadas por iPLEX <i>MassArray</i> em cada um dos genes associados a MH.	27
<b>Tabela 2.5</b> - Exões analisados por HRM em cada um dos genes associados a MH.	29
<b>Tabela 2.6:</b> Composição da mistura utilizada no rastreio de alterações do DNA por HRM.	29
<b>Tabela 2.7:</b> Condições reaccionais de amplificação por PCR que precedem o passo de HRM.	30
<b>Tabela 2.8:</b> Condições reaccionais do passo de HRM.	30
<b>Tabela 2.9:</b> Composição da mistura de reacção de PCR.	31
<b>Tabela 2.10:</b> Condições reaccionais de amplificação por PCR.	31
<b>Tabela 3.1:</b> Polimorfismo de inserção/delecção (I/D) no intrão 16 do gene <i>ACE1</i> nos 37 doentes com MH em estudo.	33
<b>Tabela 3.2:</b> Resultados obtidos por iPLEX <i>MassArray</i> e confirmados por sequenciação.	34
<b>Tabela 3.3:</b> Amostras com alterações detectadas no gene <i>TNNT2</i> e confirmadas por sequenciação.	46
<b>Tabela 3.4:</b> Amostras com alterações detectadas no gene <i>MYH7</i> e confirmadas por sequenciação.	51
<b>Tabela 3.5:</b> Amostras com alterações detectadas no gene <i>MYBPC3</i> e confirmadas por sequenciação.	57
<b>Tabela 6.1:</b> Compilação dos resultados de iPLEX <i>MassArray</i> , HRM e sequenciação.	73

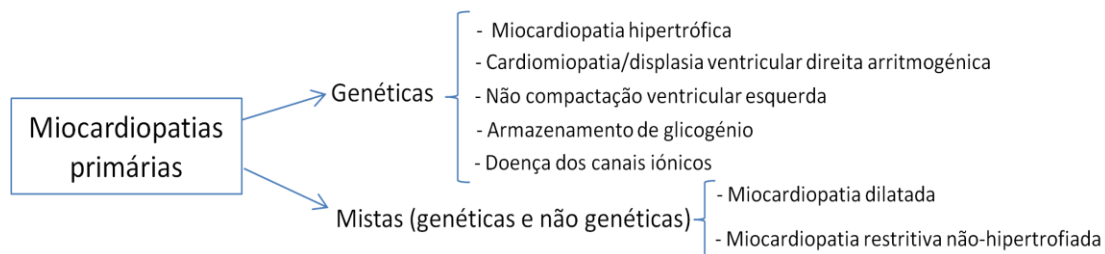


## 1 - INTRODUÇÃO

As miocardiopatias são um grupo de doenças heterogêneas do miocárdio que estão associadas a disfunção mecânica e/ou eléctrica. São actualmente classificadas em cinco categorias de acordo com critérios morfológicos e funcionais: miocardiopatia hipertrófica (MH), miocardiopatia dilatada, miocardiopatia restritiva, displasia ventricular direita arritmogénica e não-compacção ventricular esquerda (Fatkin e Graham, 2002; Hershberguer *et al.*, 2009).

Morfológicamente podem manifestar-se por um padrão de hipertrofia ao nível do ápice ventricular ou do septo interventricular ou por uma dilatação ventricular (Hershberguer *et al.*, 2009).

As miocardiopatias podem ser primárias (genéticas ou mistas – de origem genética e/ou não genética) ou secundárias (Maron *et al.*, 2006). No presente trabalho apenas será abordada a miocardiopatia hipertrófica (MH) que, como é possível observar na Figura 1.1, se enquadra nas miocardiopatias primárias de origem genética (Maron *et al.*, 2006).



**Figura 1.1:** Classificação estrutural das miocardiopatias primárias. Adaptado de Maron *et al.*, 2006 e Wexler *et al.*, 2009.

### 1.1 Epidemiologia da MH

A MH é uma doença cardíaca com um padrão de transmissão autossómico dominante, que afecta 1 em cada 500 indivíduos na população em geral (Marian, 2002; Maron, 2002; Maron *et al.*, 2006). Trata-se de uma doença heterogênea relativamente às mutações que lhe dão origem, à manifestação clínica, ao prognóstico e às estratégias de tratamento (Maron, 2002). As taxas de mortalidade dos doentes com MH são variáveis, no entanto, a informação mais recente estima que essa taxa seja 1-2% (Markoul *et al.*, 2011). A prevalência de MH é maior em indivíduos mais velhos, na medida em que a penetrância desta patologia é dependente da idade (Marian, 2002; Watkins *et al.*, 2011). A MH é a principal causa de morte súbita em jovens e atletas (Maron, 2002; Taylor *et al.*, 2004).

Em Portugal torna-se necessário realizar estudos epidemiológicos, para determinar qual o grau de incidência/prevalência da doença.

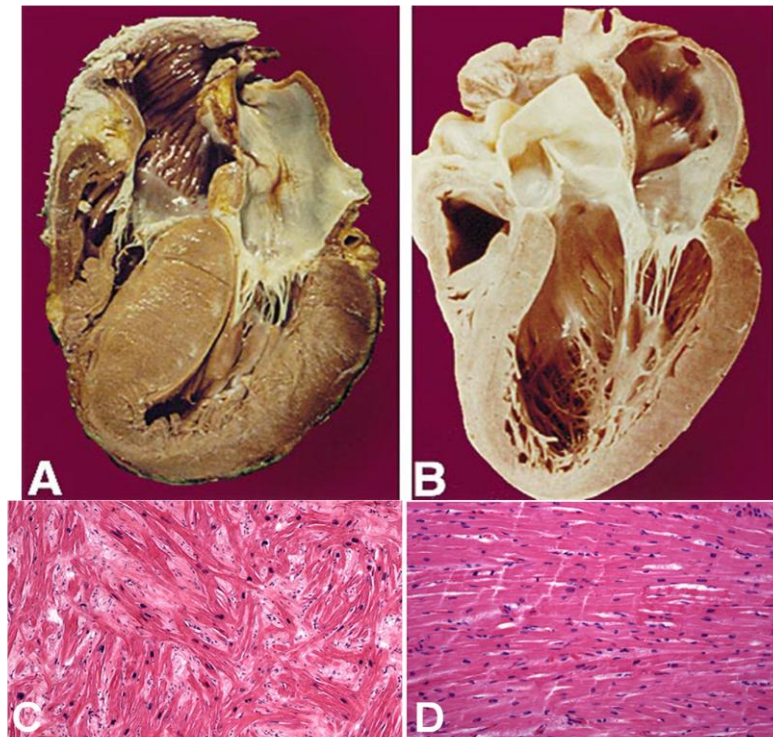
### 1.2 Fenótipo da MH

Em termos fenotípicos e histológicos, a MH caracteriza-se por uma hipertrofia do ventrículo esquerdo, com espessamento do septo interventricular e aumento do átrio, associado a desorganização celular e fibrose intersticial, sem dilatação e na ausência de outra doença cardíaca

ou sistêmica capaz de causar um espessamento evidente da parede ventricular (ex: hipertensão, estenose da válvula aórtica) (Marian 2002; Arad *et al.*, 2002; Maron *et al.*, 2006).

### 1.2.1 Características morfológicas da MH

A característica morfológica mais marcante em termos de diagnóstico de MH é a hipertrofia do ventrículo esquerdo, a qual é tipicamente assimétrica principalmente ao nível do septo interventricular, com a consequente diminuição do volume da câmara ventricular, sem justificação aparente (Figura 1.2). A nível microscópico, geralmente observa-se um aumento das dimensões dos cardiomiócitos, desarranjo fascicular e fibrose intersticial (aumento das fibras do tecido conjuntivo) (Arad *et al.*, 2002) (Figura 1.2). Na MH a função sistólica é aumentada ou, pelo menos, preservada, enquanto a função diastólica é comprometida em parte devido à hipertrofia em si, fibrose intersticial e/ou desarranjo da arquitectura dos cardiomiócitos. Pensa-se que a disfunção diastólica seja responsável pelos sintomas de falha cardíaca e de morte súbita em doentes com MH (Morimoto, 2008).



**Figura 1.2:** Aspecto macroscópico e microscópico de MH. **A-** Corte de coração humano com hipertrofia ventricular esquerda evidente. **B-** Corte de coração humano normal. **C-** Corte histológico que mostra o desarranjo dos cardiomiócitos (ampliação 10x). **D-** Corte histológico que mostra a organização normal dos cardiomiócitos (ampliação 10x) (Adaptado de Seidman e Seidman, 2001 e Ho, 2010).

### 1.2.2 Diagnóstico clínico da MH

O diagnóstico clínico de MH baseia-se, na maioria dos casos, na observação ecocardiográfica de um ventrículo esquerdo hipertrofiado e não dilatado na ausência de outra doença cardíaca ou sistêmica que possa produzir uma hipertrofia semelhante (Spirito *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas são variáveis, sendo a maioria dos doentes assintomática. De entre os que apresentam sintomas, os mais frequentes são: dispneia, angina de peito, palpitações, arritmias, falha cardíaca severa e morte súbita (Ho e Seidman, 2006; Marian, 2002). Muitas vezes a morte súbita é a primeira manifestação da MH em jovens, podendo estes apresentar um exame físico normal (Marian, 2002).

O diagnóstico clínico é feito igualmente através de electrocardiograma, onde se denotam padrões anormais, como alterações da repolarização, ondas T invertidas e ondas Q profundas. A ecocardiografia bidimensional (EEG) é considerada a técnica “*gold standard*” não invasiva usada no diagnóstico de MH, e permite avaliar entre outros parâmetros, a espessura da parede do ventrículo (valores normais até 12mm) (Maron, 2002; Maron *et al.*, 2006). Em doentes com MH, a espessura da parede do ventrículo pode variar entre 13 e  $\geq 30$ mm (Maron, 2002; Maron *et al.*, 2006). Dado que a EEG tem algumas limitações, utiliza-se também a ressonância magnética cardíaca com contraste de gadolínio que possibilita a aquisição de imagens tomográficas da câmara do ventrículo esquerdo hipertrofiado, conseguindo detectar alterações que escapam à análise por ecocardiografia, como por exemplo as zonas de fibrose (Maron, 2002; Moon *et al.*, 2004; Rickers *et al.*, 2005). A detecção de fibrose é um factor de risco de morte súbita em doentes com MH (Rubinshtein *et al.*, 2010).

É frequente encontrar electrocardiogramas normais mesmo quando existe uma hipertrofia localizada do ventrículo esquerdo. Por sua vez, podem surgir alterações no electrocardiograma antes de se observar qualquer hipertrofia. A MH apresenta uma grande heterogeneidade, dado que numa mesma família ou para uma mesma alteração, o fenótipo pode ser variável. Além disso, a MH é uma doença com baixa penetrância, ou seja, um portador de uma mutação pode não expressar a doença, de uma forma clinicamente detectável (Ho, 2011; Watkins *et al.*, 2011). Também a idade é um factor que está associado à expressão fenotípica da MH. Em crianças com idades inferiores a 13 anos é possível encontrar-se uma mutação associada a MH, sem que haja qualquer sinal de hipertrofia (Maron, 2002). Assim, uma parede de ventrículo esquerdo com uma espessura normal pode ocorrer mesmo na presença de uma mutação num gene que cause MH, sendo neste caso o diagnóstico feito por análise de DNA (Maron *et al.*, 2006).

Sendo a morte súbita muitas vezes a primeira manifestação de MH e contabilizando cerca de metade dos casos de morte pela doença, é necessário ter em conta alguns factores de risco, como prévia paragem cardíaca e taquicardia ventricular sustentada e espontânea, taquicardia ventricular não sustentada, síncope inexplicada, hipertrofia ventricular esquerda extrema, pressão sanguínea anormal em resposta ao exercício e sobretudo ter em atenção a história familiar de morte súbita. Todos estes factores aumentam o risco de morte súbita e há evidências de que doentes com 2 ou mais destes factores têm um maior risco de morte súbita relativamente aos doentes com apenas 1 factor de risco (Christiaans *et al.*, 2010; Ho, 2010; Maron, 2010).

### 1.2.3 Estratégias de tratamento

Sendo a MH uma doença de origem genética, o tratamento passa inicialmente por um alívio dos sintomas. Para isso recorre-se ao uso de  $\beta$ -bloqueantes, como o verapamil e a disopiramida. No entanto, quando ocorre reacção adversa aos medicamentos ou se trata de doentes de alto risco, existem outras alternativas, como a miectomia do septo ventricular (procedimento de Morrow), a ablação septal através da utilização de etanol absoluto, a implantação de um desfibrilhador-cardioversor, e, em último caso, o transplante cardíaco (Fifer e Vlahakes, 2008; Maron, 2002; Roberts e Sigwart, 2005).

Contudo, e apesar dos  $\beta$ -bloqueantes serem as terapias mais usadas, não revertem o fenótipo cardíaco de MH. Além disso, o uso de bloqueadores de canais de cálcio pode originar hipotensão e síncope em descanso e durante o exercício (Marian, 2010). Estudos feitos em modelos animais de MH, apontam a utilização de N-acetilcisteína (NAC) como uma das terapias com maior potencial, na medida em que reverte a hipertrofia cardíaca e a fibrose (Marian *et al.*, 2006).

### **1.3 Genética da MH**

A MH é uma doença cardíaca genética com um padrão de transmissão autossómico dominante, como referido anteriormente (ponto 1.1), causada por mutações em genes que codificam para proteínas contrácteis do sarcómero cardíaco. Actualmente sabe-se que alterações em genes não sarcoméricos são também responsáveis pelo desenvolvimento de MH (Ho, 2010). Os genes cujas mutações estão mais frequentemente associados a MH são os que codificam para a cadeia pesada  $\beta$  da miosina (*MYH7*) e para a proteína C de ligação à miosina (*MYBPC3*). Existem também outros genes associados a um menor número de casos de MH, como os que codificam para: troponina T cardíaca (*TNNT2*) e troponina I (*TNNI3*), subunidades regulatória (*MYL2*) e essencial (*MYL3*) da cadeia leve da miosina, titina (*TTN*),  $\alpha$ -tropomiosina (*TPM1*),  $\alpha$ -actina (*ACTC1*), cadeia pesada da  $\alpha$ -miosina (*MYH6*) e proteína LIM do músculo cardíaco (*CSRP3*). Os outros genes também já associados a MH e listados na tabela 1.1 contabilizam uma minoria dos casos de MH. As mutações mais comuns são as *missense* (também designadas mutações pontuais), em que um único nucleótido é alterado, podendo originar um codão que codifica um aminoácido (a.a) diferente (mutação não sinónima) (Maron, 2002; Maron *et al.*, 2006).

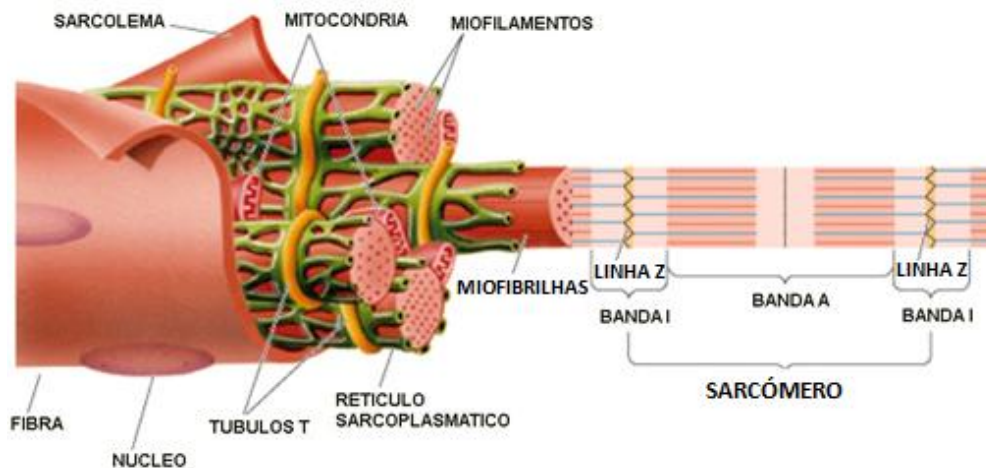
Os defeitos induzidos por proteínas sarcoméricas mutadas podem ser: (i) mecânicos (interacção da actomiosina e capacidade contráctil dos cardiomiócitos), (ii) bioquímicos (sensibilidade ao cálcio), (iii) bioenergéticos (actividade da ATPase) e/ou (iv) estruturais (montagem sarcomérica e localização subcelular). Apesar da diversidade de defeitos, todos eles originam um fenótipo comum de hipertrofia, fibrose e desarranjo fascicular dos cardiomiócitos (Marian, 2002).

Torna-se assim relevante a explicação da constituição e funcionamento sarcoméricos.



### 1.3.1 Sarcômero

O sarcômero é a unidade funcional das fibras musculares (Figura 1.3). É constituído por diferentes proteínas, que estão organizadas em filamentos finos e filamentos grossos, sendo possível observar regiões distintas, como a banda I (isotrópica) e a banda A (anisotrópica) (Figura 1.3). No interior da banda I encontra-se a linha Z e no interior da banda A encontra-se a zona H, com a linha M no interior (Figura 1.3). O sarcômero encontra-se assim delimitado por 2 linhas Z (Figura 1.3) (Fatkin e Graham, 2002).



**Figura 1.3:** Representação esquemática da organização da fibra muscular, em que se observa a unidade funcional – o sarcômero. Adaptado de <http://magisnef.wordpress.com/2007/04/02/fisiologia-muscular-componentes-del-musculo/>. (acesso a 23-6-2011)

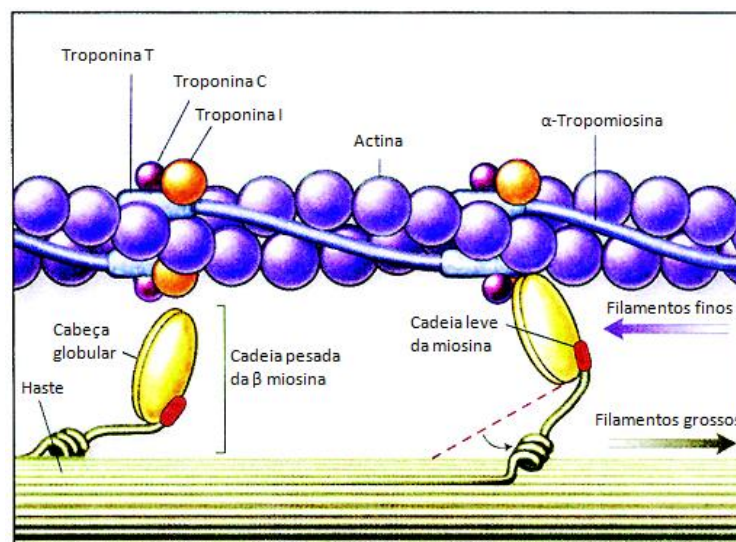
#### 1.3.1.1 Mecanismo de contracção muscular

A contracção muscular ocorre através do deslizamento entre os filamentos finos, constituídos pela actina, pelo complexo da troponina (troponina C, I e T) e pela  $\alpha$ -tropomiosina, e os filamentos grossos, constituídos pela cadeia pesada da miosina, pela proteína C de ligação à miosina e pelas subunidades essencial e regulatória da cadeia leve da miosina, aos quais a titina se associa. A cabeça globular da cadeia pesada da miosina contém locais de hidrólise de ATP e locais para ligação da actina, daí a miosina ser considerada o motor dos sarcômeros (Seidman e Seidman, 2001).

A contracção inicia-se quando, devido a um estímulo, ocorre libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático com a consequente ligação à troponina C (subunidade do complexo da troponina que tem afinidade para o cálcio). O cálcio faz com que a troponina I, que estava a cobrir o local de ligação da miosina à actina, altere a sua configuração espacial, permitindo que as duas proteínas se liguem. O ATP liga-se à miosina, sendo hidrolisado e fornecendo a energia necessária para o deslizamento entre os filamentos finos e os filamentos grossos, havendo sobreposição destes e encurtamento da fibra muscular. A força gerada é então transmitida ao citosqueleto dos miócitos através do complexo de proteínas como a proteína C de ligação à miosina e a titina. (Figura 1.4) A

contração muscular termina quando ocorre a diminuição da concentração de cálcio citoplasmático (Seidman e Seidman, 2001).

Segundo Ashrafian (2003), na MH ocorre uma utilização ineficiente do ATP, o que compromete a contração e a homeostasia nos cardiomiócitos, levando à sua hipertrofia (Ashrafian *et al.*, 2003).



**Figura 1.4:** Representação esquemática do processo de contração (Adaptado de Seidman e Seidman, 2001).

#### 1.4 Mutações causadoras de MH

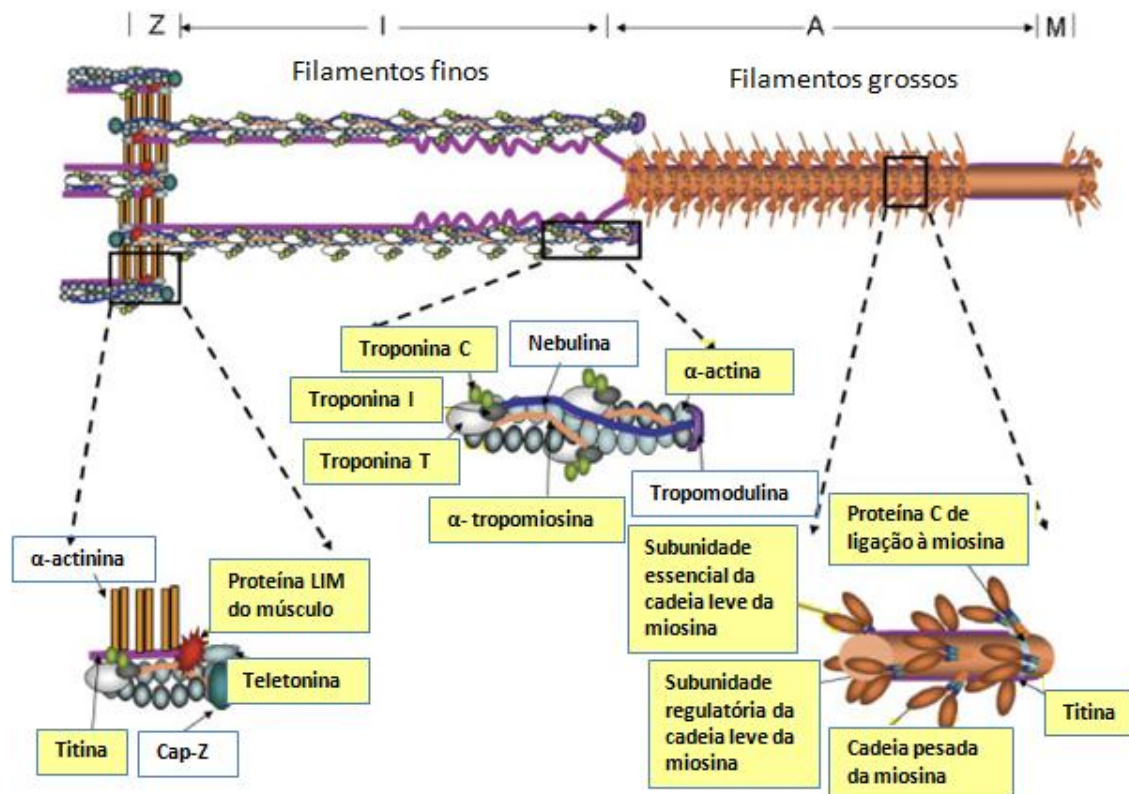
Há vários mecanismos pelos quais mutações em genes que codificam para proteínas sarcoméricas ou outras proteínas a elas associadas podem produzir MH. Algumas mutações inactivam o alelo, havendo uma baixa produção de proteína funcional – haploinsuficiência – enquanto outras mutações originam uma proteína mutante que interfere com o funcionamento da proteína normal – efeito dominante negativo (Seidman e Seidman, 2001).

Como foi referido anteriormente, a maioria das mutações causadoras de MH são mutações *missense*, sendo que a maior parte dos indivíduos afectados são heterozigóticos para a mutação. Contudo em alguns casos podem co-existir duas ou mais mutações num mesmo indivíduo no mesmo gene ou em genes diferentes, originando situações de: heterozigotia composta – duas mutações no mesmo gene; dupla heterozigotia – duas mutações heterozigóticas em dois genes diferentes; ou homozigotia – a mesma mutação nos dois alelos para o mesmo gene (Girolami *et al.*, 2010).

Nos vários estudos efectuados em doentes com MH, foram detectadas mutações fundadoras em países como a Holanda (Alders *et al.*, 2003; Christiaans *et al.*, 2010a), a Suécia (Mörner *et al.*, 2003), a África do Sul (Moolman-Smook *et al.*, 2000), a Finlândia (Jääskeläinen *et al.*, 2004), a Itália (Girolami *et al.*, 2006), o Japão (Kubo *et al.*, 2005) e o sul da Ásia (Dhandapany *et al.*, 2009). No entanto, nos EUA, a situação é distinta, dado existirem mutações “privadas”, ou seja, mutações

únicas para cada família (Keller *et al.*, 2002), apesar de terem sido igualmente descritas algumas situações de diferentes famílias que apresentam a mesma mutação (Andersen *et al.*, 2009).

Na figura 1.5 encontram-se assinaladas as principais proteínas cujas alterações estão associadas ao desenvolvimento de MH.



**Figura 1.5:** Representação esquemática de estrutura parcial de um sarcômero, mostrando o arranjo e localização dos filamentos finos e grossos. As proteínas codificadas pelos genes cujas mutações causam MH encontram-se evidenciadas a amarelo (Adaptado de Andersen *et al.*, 2009).

Até hoje foram identificados 33 genes responsáveis pelo desenvolvimento de MH (Stenson *et al.*, 2009 – HGMD; Santos *et al.*, 2011). Destes, 11 codificam para proteínas do sarcômero cardíaco, componentes tanto dos filamentos finos como grossos, e com funções contrácteis, estruturais ou regulatórias (Ho, 2010; Santos *et al.*, 2011).

#### 1.4.1 Mutações em genes que codificam para proteínas dos filamentos grossos

##### 1.4.1.1 Miosina

A miosina é uma proteína hexamérica constituída por 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves. A miosina cardíaca tem 2 isoformas: cadeia pesada  $\beta$  da miosina e cadeia pesada  $\alpha$  da miosina. A  $\beta$ -miosina é expressa predominantemente nos ventrículos e a  $\alpha$ -miosina é expressa no átrio durante a fase adulta. Isto acontece apenas em grandes mamíferos. Em ratinho, a  $\alpha$ -miosina é a isoforma

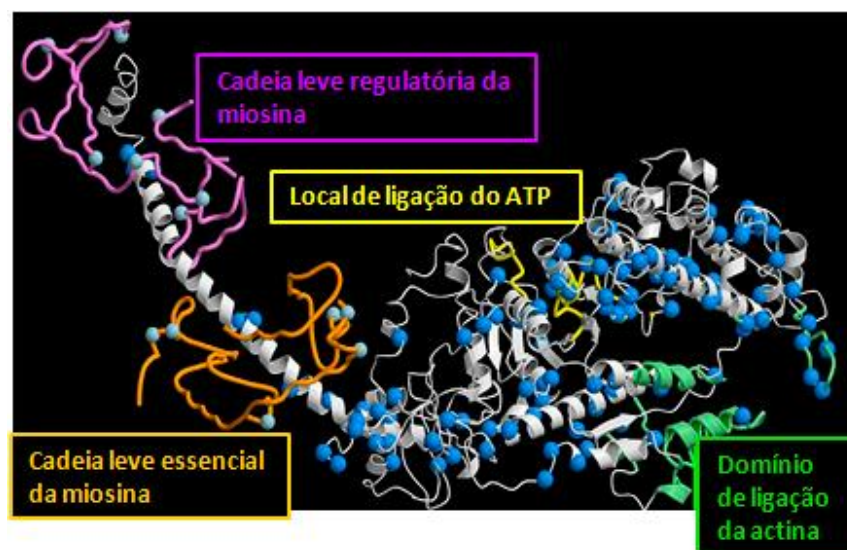
predominantemente expressa nas aurículas e nos ventrículos, pelo que este modelo animal não deve ser usado para estudar mutações na  $\beta$  miosina (Fatkin e Graham, 2002; Morimoto, 2008).

#### 1.4.1.1.1 Mutações na cadeia pesada $\beta$ da miosina (*MYH7*)

O gene *MYH7* codifica para a cadeia pesada  $\beta$  da miosina. É um gene constituído por 41 exões, 38 dos quais contribuem para a formação da proteína (Fatkin e Graham, 2002). É a maior proteína contráctil do músculo cardíaco e tem 2 domínios funcionais: uma cabeça globular com a região N-terminal e uma haste com a região C-terminal. A cabeça liga-se ao ATP, e tem actividade ATPásica, que exerce a força contráctil e contém também um domínio de ligação à actina para formar o complexo actina-miosina essencial para gerar força. O domínio haste interage com as cadeias leves da miosina (Bashyam *et al.*, 2003; Ho, 2010).

As mutações no gene *MYH7* são a causa mais frequente de MH, contabilizando entre 30-40% dos casos, sendo a maior parte das quais mutações *missense* (Ho, 2010; Morimoto, 2008).

Estudos sobre a estrutura tridimensional da proteína mostraram que estas mutações ocorrem essencialmente em 4 domínios da cabeça da miosina: local de ligação da actina, centro activo da proteína, junto às 2 cisteínas reactivas na região da dobra (cabeça-haste) e na zona helical junto ao local de ligação da cadeia leve (Figura 1.6) (Bashyam *et al.*, 2003; Fatkin e Graham 2002; Ho, 2010; Morimoto, 2008). São poucas as mutações que ocorrem na haste da miosina, tendo sido proposto que mutações nesta região poderiam alterar a transmissão de força da cabeça para o corpo do filamento grosso (Fatkin e Graham, 2002). As mutações no gene *MYH7* têm um prognóstico maligno, dado estarem associadas a um aparecimento precoce da doença, a uma elevada penetrância em adultos e a um alto risco de morte súbita (por exemplo nas mutações Arg403Gln e Arg453Cys, em que a primeira se localiza na interface actina-miosina e a segunda no local de ligação do ATP) (Maron, 2002; Morimoto, 2008; Fatkin e Graham, 2002; Bashyam *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2009).



**Figura 1.6:** Estrutura tridimensional da cadeia pesada  $\beta$  da miosina e localização das mutações associadas a MH (representadas a azul). Modelo baseado em cristalografia de raios-X da estrutura da miosina de galinha. Os resíduos de a.a apresentados correspondem aos resíduos humanos de

Asp3 a Lys841. A verde encontra-se o domínio de ligação da actina e a amarelo o local de ligação do ATP. A cadeia leve essencial da miosina está representada a laranja e a violeta está representada a cadeia leve regulatória da miosina. As mutações nas cadeias leves estão representadas a azul claro (Adaptado de Ho, 2010).

#### 1.4.1.1.2 Mutações na cadeia pesada $\alpha$ da miosina (MYH6)

O gene *MYH6* codifica para a cadeia pesada  $\alpha$  da miosina. O gene é constituído por 39 exões que codificam para uma proteína de 1939 a.a. (Finn *et al.*, 2010). Niimura e colaboradores, em 2002, descreveram a primeira mutação neste gene: Arg795Gln. Trata-se de uma mutação *missense*, que afecta um resíduo conservado da proteína, através do qual a cadeia pesada interage com as cadeias leves essenciais. Esta substituição pode assim perturbar a interacção entre cadeias (Niimura *et al.*, 2002). Tal como é possível verificar pela análise da tabela 1.1, foram já descritas muitas outras mutações neste gene.

#### 1.4.1.1.3 Mutações na cadeia leve essencial da miosina (MYL3)

O gene *MYL3* codifica para a cadeia leve essencial da miosina. O gene é constituído por 7 exões, 6 dos quais contribuem para a formação da proteína (Fatkin e Graham, 2002). Mutações no gene *MYL3* são uma causa rara de MH (<1%) (Tabela 1.1) (Morimoto, 2008). Por exemplo, a mutação Met149Val faz com que a taxa de translocação entre actina e miosina seja maior, estando associada a um prognóstico benigno (Bashyam *et al.*, 2003; Morimoto, 2008).

#### 1.4.1.1.4 Mutações na cadeia leve regulatória da miosina (MYL2)

O gene *MYL2* codifica para a cadeia leve regulatória da miosina. O gene é constituído por 7 exões que codificam para uma proteína com 166 a.a. (Fatkin e Graham, 2002). Sendo uma proteína que se liga ao cálcio, mutações neste gene levam à alteração do local de fosforilação e/ou de ligação ao cálcio (Richard *et al.*, 2003; Fatkin e Graham, 2002). Richard e colaboradores (2003) mostraram que a mutação de *splicing* IVS5-1:A>G origina um codão stop prematuro, podendo ter um prognóstico maligno. Moss e Fitzsimons (2006) mostraram que a proteína é necessária para a correcta montagem dos filamentos grossos, apesar do mecanismo pelo qual esse processo acontece não ser ainda conhecido.

#### 1.4.1.2 Proteína C de ligação à miosina (MYBPC3)

O gene *MYBPC3* codifica para a proteína C de ligação à miosina. É um gene constituído por 37 exões, dos quais 34 codificam para a proteína (Cardim *et al.*, 2005; Fatkin e Graham, 2002). Tem funções estruturais, ligando-se à titina e à cadeia pesada da miosina e, apesar de não ser essencial para a formação e manutenção da estrutura do sarcómero, a sua ausência leva a hipertrofia cardíaca e disfunção (Cardim *et al.*, 2005; Flashman *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2002). As mutações no gene *MYBPC3* são uma das causas mais frequentes de MH, contabilizando 30-40% dos casos da doença (Ho, 2010). A maioria das mutações são *missense*, mas também são frequentes as inserções (ex. InsG791), deleções (ex. Lis505Del e Lis813Del) e mutações de *splicing* (Morimoto, 2008; Ehlermann

*et al.*, 2008; Cardim *et al.*, 2005; Maron, 2002; Stenson *et al.*, 2009 – *Human Gene Mutation Database* - HGMD).

Na população holandesa foram descritas 3 mutações fundadoras: c.2373-2374insG (p.Trp792fsX17), c.2864-2865delCT (p.Pro955fsX95) e c.2827 C>T (p.Arg943X), que apresentam uma distribuição geográfica específica (Christiaans *et al.*, 2010a).

Geralmente as mutações em *MYBPC3* estão associadas a um aparecimento tardio de MH, menor hipertrofia, baixa penetrância e prognóstico benigno (Cardim *et al.*, 2005). No entanto esta ideia tem vindo a mudar, uma vez que já foram detectadas mutações que estão associadas a uma progressiva falha cardíaca e elevado risco de morte súbita, mesmo em jovens, como por exemplo as mutações IVS23+1G>A e Gln689His (Oliva-Sandoval *et al.*, 2010; Briona *et al.*, 2010; Van Driest *et al.*, 2004).

Ortiz e colaboradores (2009) descreveram uma nova mutação em homozigotia em *MYBPC3*: IVS6+5 G>A (g5261G>A), que pode afectar o *splicing*, originando uma proteína truncada. Os doentes apresentavam sintomas em idade precoce, marcada hipertrofia e disfunção sistólica e diastólica, exemplificando o efeito da dose de um gene na severidade da expressão da doença. Estudos funcionais, com mutações de efeito semelhante, demonstraram que o péptido truncado, que é produzido pelo alelo mutante, é degradado antes de ser incorporado no sarcómero (haploinsuficiência) (Ortiz *et al.*, 2009).

De acordo com Van Driest e colaboradores (2005), que efectuaram uma análise estatística combinada de 5 populações para MH, não se detectaram diferenças significativas relativamente a mutações em *MYBPC3* e *MYH7* associados a MH e a respectiva expressão fenotípica (Van Driest *et al.*, 2005).

Estudos mais recentes mostram que é necessário cuidado na atribuição de um prognóstico para uma determinada mutação ou mutações de um gene particular, visto que a maioria dos estudos anteriores foram efectuados em pequenas coortes envolvendo famílias grandes com expressão e penetrância variáveis da doença (Christiaans *et al.*, 2010; Bos *et al.*, 2009).

#### 1.4.2 Mutações em genes que codificam para proteínas dos filamentos finos

##### 1.4.2.1 Troponina T cardíaca (*TNNT2*)

A troponina cardíaca é um complexo constituído por 3 proteínas: troponina T, troponina I e troponina C.

O gene *TNNT2* codifica para a proteína troponina T cardíaca, cuja função é ligar-se à  $\alpha$ -tropomiosina, movendo-a, para que os locais de ligação da miosina à actina fiquem expostos. Neste gene foram já identificadas mutações *missense*, mutações de *splicing* (podem originar proteínas truncadas) e pequenas deleções. (Bashyam *et al.*, 2003; Morimoto, 2008; Stenson *et al.*, 2009).

Doentes com mutações em *TNNT2* apresentam uma baixa ou moderada hipertrofia, mas têm um prognóstico maligno, sendo que os dados apontam para uma elevada incidência de morte súbita (Michels *et al.*, 2009; Morimoto, 2008; Brito e Madeira, 2005). As mutações *missense* Ile79Asn e Arg92Gln, a deleção  $\Delta$ Glu160 e a mutação de *splicing* no intrão 16G>A desenvolvem fenótipo clínico semelhante e maligno (Morimoto, 2008). Uma das mutações *missense* mais descrita é a Arg92Trp



uma vez que está associada a um aumento da frequência de morte súbita em doentes com MH (Heradien *et al.*, 2009; Michels *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2006). A mutação Phe87Leu afecta o local de ligação da troponina à  $\alpha$ -tropomiosina, havendo um fenótipo de hipertrofia média e alto risco de morte súbita associado (Maron, 2002). Na população espanhola, a mutação Arg278Cys que se localiza na zona de ligação da tropomiosina com as troponinas I e C foi associada a uma hipertrofia média, penetrância incompleta e aparecimento tardio de MH (Gimeno *et al.*, 2009).

Estudos funcionais efectuados em modelos animais sugerem que um aumento na sensibilidade ao cálcio na contracção cardíaca está envolvido na malignidade de MH associada a mutações na troponina T cardíaca (Miller *et al.*, 2001; Harada e Potter, 2004).

#### 1.4.2.2 Troponina I cardíaca (*TNNI3*)

O gene *TNNI3* codifica para a proteína troponina I cardíaca, que é responsável pela inibição do local de ligação da miosina à actina (Tabela 1.1) (Bashyam *et al.*, 2003). Na presença de cálcio, este liga-se à troponina C, levando a uma alteração da conformação da troponina I, ocorrendo a ligação entre a miosina e a actina o que, na presença de ATP, vai possibilitar a contracção muscular (Seidman e Seidman, 2001).

Neste gene estão identificadas mais de 30 mutações *missense*, a maioria das quais ao nível do domínio C terminal da proteína. (Tabela 1.1) Estudos funcionais realizados em ratinhos transgénicos que expressavam a alteração Arg145Gly (alteração que se encontra no local de inibição da proteína) mostraram que estes desenvolvem características patológicas típicas de MH, nomeadamente desarranjo dos cardiomiócitos e fibrose intersticial. No entanto, a hipertrofia cardíaca é pouco significativa (Morimoto, 2008).

Takahashi-Yanaga e colaboradores (2001) mostraram que, pelo menos 5 mutações (p.Arg145Gly, p.Arg145Gln, p.Arg162Trp, Lys183del e p.Lys206Gln) estão associadas a um aumento da sensibilidade ao cálcio, por parte das fibras musculares, levando a uma hipercontractibilidade com disfunção diastólica (Takahashi-Yanaga *et al.*, 2001; Bashyam *et al.*, 2003). Na população portuguesa foram descritas por Brito e Madeira (2005) duas mutações *missense* no gene *TNNI3*: Ala157Val e Ser199Asn (Brito e Madeira, 2005).

#### 1.4.2.3 Troponina C cardíaca (*TNNC1*)

O gene *TNNC1* codifica para a troponina C cardíaca. Esta proteína tem afinidade para o cálcio e essa ligação define o início do processo de contracção muscular, uma vez que leva a alterações noutras proteínas, nomeadamente na troponina I, ocorrendo exposição da actina para posterior ligação à miosina (Morimoto, 2008; Seidman e Seidman, 2001).

A primeira mutação no gene *TNNC1* e associada a MH foi descrita por Hoffman e colaboradores em 2001. Trata-se da alteração Leu29Gln, que foi descrita em doentes com um aparecimento tardio da doença (Hoffman *et al.*, 2001). Nesta mutação, uma pequena região do domínio N-terminal, que contém o resíduo Leu29, interage com a região N-terminal da Serina 22/23 e esta interacção é eliminada aquando da fosforilação da Serina 22/23 pela proteína cinase A (PKA), levando a uma diminuição da sensibilidade ao cálcio nos miofilamentos (Hoffman *et al.*, 2001). Este processo interfere com a interacção entre a troponina C e a troponina I (Morimoto, 2008; Stenson *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.4 $\alpha$ -Tropomiosina (*TPM1*)

O gene *TPM1* codifica várias isoformas de tropomiosina. O músculo estriado esquelético expressa 2 isoformas de tropomiosina ( $\alpha$ -tropomiosina e  $\beta$ -tropomiosina), mas o músculo estriado cardíaco expressa essencialmente  $\alpha$ -tropomiosina, que é constituída por 2 cadeias enroladas uma na outra, que conferem estrutura e estabilidade aos filamentos finos. A  $\alpha$ -tropomiosina tem dois locais de ligação à troponina T, um deles sensível ao cálcio e o outro, insensível ao cálcio (Morimoto, 2008; Fatkin e Graham, 2002).

As mutações em *TPM1* são uma causa pouco comum de MH (~5%). Estudos funcionais em ratinhos transgênicos, heterozigóticos para a mutação Asp175Asn ou para a mutação Glu180Gly revelaram um fenótipo normal e uma longevidade aparentemente normal, apresentando estas mutações, neste modelo animal, um prognóstico favorável. Estudos em cardiomiócitos mostraram um aumento na sensibilidade ao cálcio, que se manifestava como uma disfunção diastólica *in vivo* (Morimoto, 2008; Michele *et al.*, 2002).

#### 1.4.2.5 Actina cardíaca (*ACTC1*)

No genoma humano estão presentes 20 genes que codificam para a actina, 4 dos quais encontram-se nos músculos cardíaco, esquelético e liso. As isoformas de actina cardíaca e actina esquelética são co-expressas no miocárdio e no músculo esquelético (Morimoto, 2008; Fatkin e Graham, 2002). O gene *ACTC1* codifica para a  $\alpha$ -actina cardíaca. O domínio N-terminal da actina cardíaca é o local de ligação da miosina, enquanto o domínio C-terminal tem locais para a ligação da  $\alpha$ -actinina e para a distrofina (Fatkin e Graham, 2002). A actina é o maior constituinte dos filamentos finos e está directamente envolvida na produção de força (Bashyam *et al.*, 2003).

Mutações em *ACTC1* são uma causa rara de MH (~1.5%). As mutações *missense* diminuem a estabilidade do monómero de actina e comprometem a formação dos filamentos, sugerindo que a incapacidade para formar miofilamentos e/ou acumulação de agregados seja um dos efeitos celulares patológicos das mutações em *ACTC1* (Morimoto, 2008). Por exemplo, a mutação Ala295Ser resulta na não ligação da miosina à actina, logo numa menor capacidade na geração de força e consequente hipertrofia compensatória (Bashyam *et al.*, 2003).

#### 1.4.3 Mutações no gene que codifica para a titina (*TTN*)

O gene *TTN* codifica para a titina, que é uma proteína de elevado peso molecular (3 kDa) e um importante componente do sarcómero cardíaco (Fatkin e Graham, 2002). A titina é determinante na rigidez muscular e sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, sendo também um sensor biomecânico (Granzier *et al.*, 2005).

Estudos efectuados em levedura sugerem que a mutação Arg740Leu leva a uma alteração na afinidade entre a titina e a  $\alpha$ -actinina (Morimoto, 2008; Bashyam *et al.*, 2003).

#### 1.4.4 Mutações em genes que codificam para as proteínas do disco Z (genes não sarcoméricos)

As proteínas do disco Z estão em cada uma das extremidades do sarcómero, delimitando-o e interagindo com a titina. O conjunto de proteínas que constituem o disco Z, tais como a  $\alpha$ -actinina 2, a



anquirina 1, a proteína LIM do músculo, o domínio 3 de ligação a LIM, a miozenina 2, a teletonina e a vinculina, têm como principal função manter a estrutura e arquitectura celulares, funcionando como sensores de stress mecânico (Bos e Ackerman, 2010).

#### 1.4.4.1 Teletonina (TCAP)

O gene *TCAP* codifica para a proteína teletonina que faz parte dos componentes do disco Z. A teletonina liga-se através do domínio N-terminal à titina. Bos e colaboradores (2006) identificaram 3 novas mutações, 2 das quais *missense*, sendo que o paciente que tinha a mutação Arg70Trp apresentava uma elevada hipertrofia e espessura do septo, fenótipo este associado à localização da mutação na proteína, visto que se situava no domínio funcional essencial para ligação à proteína LIM do músculo cardíaco (Bos *et al.*, 2006).

#### 1.4.4.2 Proteína LIM do músculo cardíaco (CSRP3)

O gene *CSRP3* codifica para a proteína LIM do músculo cardíaco. Esta proteína constituída por 194 a.a tem uma localização essencialmente citosólica nos cardiomiócitos, não estando confinada apenas a estruturas do sarcómero. Actua em conjunto com a titina e a teletonina, estabilizando-as, funcionando o conjunto como sensor de stress mecânico (Geier *et al.*, 2008). A proteína é constituída por 2 domínios: um deles interage com a  $\alpha$ -actinina, enquanto o outro interage com os filamentos de actina (Fatkin e Graham, 2002).

As mutações associadas a este gene são maioritariamente *missense*, como é o caso das mutações descritas por Geier e colaboradores em 2003: Leu44Pro, Ser54Arg, Glu55Gly e Cys58Gly. Todas estas mutações afectam resíduos conservados do domínio 1 da proteína, que é responsável pela interacção com a  $\alpha$ -actinina e com alguns factores de transcrição específicos do músculo. Os indivíduos afectados apresentam uma grande variação no grau de hipertrofia (Geier *et al.*, 2003). Também foi já descrita uma deleção responsável pelo surgimento de um *frameshift* no exão 3 do gene *CSRP3*: K42fs/165. Esta alteração situa-se, tal como as anteriormente referidas, no domínio de interacção da proteína com a  $\alpha$ -actinina (Bos *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2011).

#### 1.4.4.3 Miozenina 2 (MYOZ2)

O gene *MYOZ2* codifica para a miozenina 2, também designada de calsarcina-1 sarcomérica. Tem como principal função a regulação negativa das funções da calcineurina, bem como a regulação da ligação da calcineurina à  $\alpha$ -actinina (Frey *et al.*, 2004). Pensa-se que mutações em *MYOZ2* causadoras de MH levem à activação da via da calcineurina. Osio e colaboradores (2007) descreveram *MYOZ2* como um novo gene causador de MH, apesar de as mutações neste gene serem pouco comuns (1:250 casos de MH).

Em suma, a maioria das mutações associadas a MH ocorrem nos genes que codificam para a cadeia pesada  $\beta$  da miosina cardíaca (*MYH7*), para a proteína C de ligação à miosina (*MYBPC3*), para a troponina T cardíaca (*TNNT2*) e para a troponina I cardíaca (*TNNI3*), que em conjunto, contabilizam 80-90% dos casos de MH (Christiaans *et al.*, 2010a; Ho, 2010).

**Tabela 1.1:** Genes e proteínas associadas a MH. Para cada gene encontra-se descrito a sua localização cromossômica, o número de mutações descritas, e dessas, quais as que estão associadas a MH. Fonte: Stenson *et al.*, 2009 - HGMD acesso a 21-09-2011.

Nome do Gene	Nome da proteína	Localização cromossômica	Número de mutações	
			Descritas	Associadas a MH
<i>MYBPC3</i>	Proteína C de ligação à miosina cardíaca	11p11.2	298	169
<i>MYH7</i>	Cadeia pesada $\beta$ da miosina	14q12	335	221
<i>MYL2</i>	Cadeia leve regulatória da miosina	12q23-q24.3	13	10
<i>MYL3</i>	Cadeia leve essencial da miosina	3p21.3-p21.2	11	5
<i>MYH6</i>	Cadeia pesada $\alpha$ da miosina	14q12	23	2
<i>TNNT2</i>	Troponina T cardíaca	1q32	60	31
<i>TNNI3</i>	Troponina I cardíaca	19q13.4	50	27
<i>TNNC1</i>	Troponina C cardíaca	3p21.3-p14.3	13	5
<i>ACTC1</i>	$\alpha$ -actina cardíaca	15q11-q14	18	9
<i>TPM1</i>	$\alpha$ –tropomiosina	15q22.1	24	11
<i>TTN</i>	Titina	2q31	25	2
<i>MYOZ2</i>	Miozenina 2	4q26	2	2
<i>CSRP3</i>	Proteína LIM do músculo cardíaco	11p15.1	14	7
<i>TCAP</i>	Teletonina	17q12	14	5

## 1.5 Outras mutações em genes não sarcoméricos

### 1.5.1 Fenocópias

Além das mutações já descritas para os genes sarcoméricos e não sarcoméricos acima referidos, foram também já descritas mutações noutros genes não sarcoméricos, em que os doentes manifestam um fenótipo semelhante ao de MH. Isto deve-se à presença de fenocópias, ou seja, alterações noutros genes que estão envolvidos no metabolismo celular, mas que originam hipertrofia cardíaca. Por exemplo, mutações nos genes *PRKAG2* e *LAMP2* que codificam para a subunidade  $\gamma 2$  da AMP cinase e para a proteína 2 associada à membrana dos lisossomas, respectivamente, estão associadas a vários graus de hipertrofia (Ho e Seidman, 2006; Maron, 2006). Nos indivíduos com mutações em *PRKAG2* dá-se uma acumulação de glicogénio nos cardiomiócitos, enquanto os doentes com mutação em *LAMP2* têm uma acumulação de vesículas com produtos do metabolismo celular por degradar. Contudo, em nenhum dos casos se observa o desarranjo dos cardiomiócitos nem a fibrose intersticial que são típicos nos casos de verdadeira MH (Geier *et al.*, 2008; Ho e Seidman, 2006; Maron, 2006; Arad *et al.*, 2002). A incidência de fenocópias em doentes com diagnóstico clínico de MH é desconhecida, mas estima-se que seja cerca de 10% (Marian, 2010).

A distinção entre MH e fenocópias é importante, na medida em que a terapêutica é significativamente diferente (Marian, 2010).

Existem também genes que codificam para proteínas envolvidas na libertação e sinalização do cálcio, bem como proteínas mitocondriais, cujas alterações estão associadas ao desenvolvimento de MH, como por exemplo o gene *COX15* que codifica para uma proteína envolvida na estrutura do citocromo C oxidase. Mutações neste gene foram associadas ao aparecimento precoce de hipertrofia cardíaca (Antonicka *et al.*, 2003).

### 1.5.2 Genes modificadores

A extensão da hipertrofia cardíaca é variável, não apenas entre membros de diferentes famílias, mas também dentro de membros da mesma família. Isto sugere que existe envolvimento de outros factores para além das mutações (Marian, 2002). A heterogeneidade na evolução clínica explica-se, em parte, pelos diferentes papéis que as proteínas têm no sarcómero e do efeito que uma dada mutação tem na estrutura e função proteicas (Arad *et al.*, 2002). No entanto, indivíduos com mutações idênticas apresentam fenótipos diferentes (Brito *et al.*, 2003), sendo o fenótipo final o resultado de interações entre mutações “causais”, carga genética (genes modificadores) e provavelmente factores ambientais. Os genes modificadores não causam a doença, mas afectam a severidade da expressão fenotípica (Marian, 2002).

Os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) são descritos como modificadores da hipertrofia, devido ao seu papel no controlo da pressão sanguínea e dos efeitos biológicos na hipertrofia dos cardiomiócitos, visto que influenciam a espessura e estrutura do ventrículo (Merwe *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Merwe e colaboradores (2008) mostraram que o gene *ACE2*, que codifica para a enzima conversora da angiotensina-2, tem um papel importante na alteração da extensão da hipertrofia que se desenvolve em MH, independentemente da mutação que causou a doença.

Variantes funcionais do gene *ACE1*, que codifica para a enzima conversora da angiotensina-1, estão associadas a um risco acrescido de morte súbita e a uma severidade na hipertrofia ventricular esquerda (Ortlepp *et al.*, 2002). A inibição de ACE-1 induz a regressão de hipertrofia cardíaca e previne a dilatação e a remodelação do ventrículo após enfarte. Observou-se uma associação entre o polimorfismo de inserção (I) – deleção (D) no gene *ACE1* devido à presença ou ausência da repetição de 287pb da sequência *Alu* no intrão 16 e o risco de morte súbita em doentes com MH. O polimorfismo ID é considerado funcional, porque exerce um efeito co-dominante nos níveis de ACE-1 no plasma, nos tecidos e nas células. Um genótipo DD é mais comum em famílias com MH, com grande incidência de morte súbita (Marian, 2002). Também polimorfismos em *ACE2* podem modificar a hipertrofia do ventrículo esquerdo em doentes masculinos com MH (Wang *et al.*, 2008). Este gene é altamente expresso no coração, rins e testículos. A associação entre os polimorfismos neste gene e a hipertrofia encontra-se nos homens, mas não nas mulheres, provavelmente devido a efeitos específicos causados por hormonas sexuais como a testosterona e o estrogénio que afectam os componentes do RAAS. Além disso, *ACE2* localiza-se no cromossoma X, o que justifica os diferentes efeitos de acordo com o género (Wang *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2002).

Também os genes que codificam para proteínas envolvidas nas vias de sinalização do cálcio são potencialmente modificadores da expressão de MH. Em 2009, Friedrich e colaboradores descreveram

um novo polimorfismo (-34T>A) na região do promotor do gene que codifica para a calmodulina III, que funciona como sensor intracelular dos níveis de cálcio e tem um papel essencial na manutenção da homeostasia deste ião. Caracterizaram este polimorfismo como modificador da expressão de MH, uma vez que afecta a expressão de calmodulina, o que vai interferir com os níveis de cálcio livre e com a contracção muscular (Friedrich *et al.*, 2009).

Por todas estas razões, os genes modificadores podem ser importantes alvos terapêuticos (Marian, 2002).

### **1.6 Mutações Compostas**

A maioria dos doentes com MH é portador de uma mutação em heterozigotia, mas apesar de ser uma doença autossómica dominante, há alguns indivíduos heterozigóticos compostos, ou seja, que têm 2 mutações no mesmo gene ou em genes diferentes (3-5% dos casos de MH) (Christiaans *et al.*, 2010). Estes indivíduos apresentam manifestações mais severas da doença, nomeadamente um aparecimento precoce, uma hipertrofia mais acentuada do ventrículo esquerdo e uma maior taxa de morte súbita (Christiaans *et al.*, 2010; Ingles *et al.*, 2005; Arad, *et al.*, 2002). Uma explicação plausível para as consequências de genótipos complexos é o facto de múltiplas proteínas anormais dos miofilamentos resultarem numa desorganização mais profunda dos mecanismos do sarcómero, da energia e disfunção dos cardiomiócitos (Girolami *et al.*, 2010). Assim, o número de mutações identificadas num indivíduo com MH pode ser um factor importante na determinação da severidade do fenótipo (Ingles *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2003).

Deprez e colaboradores (2006) descreveram 2 casos de recém-nascidos com MH severa causada por mutações em heterozigotia em ambos os alelos do gene *MYBPC3*, que como foi referido anteriormente no ponto 1.4.1.2, estaria associado a um aparecimento tardio e sintomas pouco severos. Sugerem que a severidade dos sintomas se deve ao facto de, em ambos os casos, não haver expressão de nenhuma cópia funcional do gene (Deprez *et al.*, 2006).

A presença de 2 ou mais mutações, em indivíduos heterozigotas compostos e/ou homozigotas, podem ajudar a explicar porque razão mais de 10% dos doentes com MH desenvolvem um fenótipo semelhante a miocardiopatia dilatada numa fase tardia (Hilfiker-Kleiner e Knöll, 2008; Arad *et al.*, 2002).

### **1.7 Diagnóstico Genético**

O diagnóstico genético de MH baseia-se na detecção de mutações através de várias metodologias, nomeadamente: dHPLC (cromatografia líquida desnaturante de alta resolução, do inglês *denaturing High-Performance Liquid Chromatography*), SSCP (polimorfismo de conformação de cadeia simples, do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*), DGGE (electroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e sequenciação automática de DNA nas regiões exónicas e nas zonas de fronteira exão-intrão e intrão-exão (Arad *et al.*, 2002; Ingles, *et al.*, 2005). Em Portugal, o diagnóstico genético é habitualmente realizado através

da pesquisa de mutações por sequenciação automática dos principais genes associados a MH: *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNI3*, *TPM1* e *MYL2* (Genomed, Instituto de Medicina Molecular, IMM) e *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *ACTC1*, *TPM1*, *MYL2* e *MYL3* (Genetest, Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto - IPATIMUP). No entanto, a análise genética realizada a indivíduos com MH apenas detecta mutações em ~60% dos casos (Arad *et al.*, 2002; Geier *et al.*, 2008). Pelo facto de ~40% dos pacientes ficarem por caracterizar torna-se importante o desenvolvimento e implementação de metodologias mais eficazes e menos morosas que as utilizadas habitualmente no diagnóstico genético de MH.

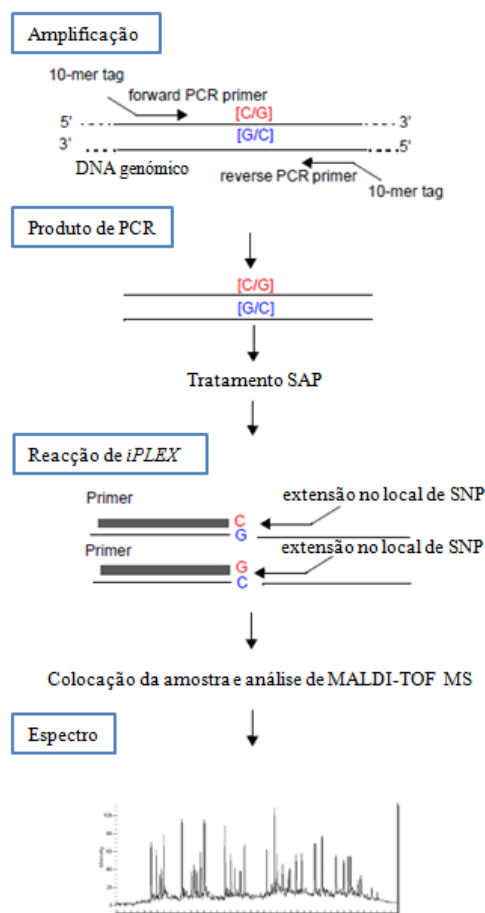
### 1.8 iPLEX MassArray

A metodologia de iPLEX MassArray com análise por espectrometria de massa MALDI-TOF (espectrometria de massa de matriz sujeita a laser de dessorção/ionização – tempo de voo, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – time of flight Mass Spectrometry*) tem sido utilizada na detecção de polimorfismos ou mutações pontuais conhecidas em várias doenças genéticas. Em 2008, Wright e colaboradores, desenvolveram um teste para detecção de 56 mutações causadoras de hipercolesterolemia familiar, baseado na tecnologia de iPLEX MassArray (Wright *et al.*, 2008). Também em 2010, Briona e colaboradores demonstraram o potencial desta tecnologia no diagnóstico de MH pelo desenvolvimento de um teste para detectar 658 mutações conhecidas (Briona *et al.*, 2010).

Um ensaio de iPLEX é um processo baseado na amplificação de uma região que engloba a mutação a estudar, seguido de uma reacção de extensão de um iniciador (*primer*), desenhado para detectar diferenças conhecidas de um único nucleótido numa determinada sequência ([http://www.sequenom.com/getdoc/197b98fa-93f7-40e8-9deb-a8dcfecf899e/iPLEX-brochure\\_web/](http://www.sequenom.com/getdoc/197b98fa-93f7-40e8-9deb-a8dcfecf899e/iPLEX-brochure_web/)). É um método de genotipagem que permite detectar um elevado número de inserções, deleções, substituições e/ou de outras alterações já conhecidas, em DNA amplificado, para um grande número de amostras, em pouco tempo e a um baixo custo (Ragoussis *et al.*, 2006; Sequenom, iPLEX™ Gold Application Guide, 2007).

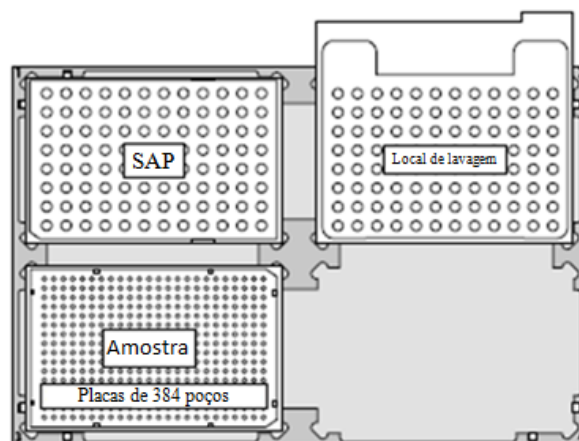
O ensaio consiste numa reacção de PCR (reacção em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) inicial da região que contém a mutação em estudo, seguida da extensão de uma única base usando didesoxirribonucleótidos (ddNTPs) terminadores, que vão ser adicionados ao oligonucleótido iniciador (*primer*) que emparelha na região adjacente ao local da alteração de interesse. Uma característica importante deste ensaio é que este PCR é *multiplex*, ou seja permite amplificar em simultâneo várias regiões do genoma que, potencialmente, contenha mutações/polimorfismos de interesse (Santos *et al.*, 2011). Estas regiões sofrem posteriormente uma reacção de extensão de um nucleótido (a base mutada). A massa dos produtos da reacção de extensão é determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF, identificando-se deste modo a alteração no DNA (Figura 1.7).

Todo o processo começa com a escolha dos polimorfismos/mutações a analisar. Para isso, pode recorrer-se a uma base de dados, como o HGMD. A definição dos polimorfismos a analisar vai condicionar o desenho dos *primers* efectuado pelo *software* MassArray assay design 3.1.



**Figura 1.7:** Esquema de um ensaio de iPLEX. Adaptado de iPLEX™ Gold Application Guide, 2007.

O primeiro passo depois da extracção de DNA é a amplificação das amostras usando a técnica de PCR *multiplex*. Assim, numa só reacção é possível obter várias amplicões de diferentes zonas do genoma de um paciente, de acordo com a combinação de *primers* presentes na mistura de reacção. As reacções decorrem em placas de 384 poços, sendo o desenho da placa optimizado de acordo com o critério pretendido, dependendo do número de amostras a analisar e do conjunto de *primers* que vão ser usados na amplificação (*plex*). Depois dessa primeira amplificação, os produtos de PCR são sujeitos a um tratamento com fosfatase alcalina de camarão (SAP), que cliva o fosfato dos desoxirribonucleótidos (dNTPs) não incorporados, convertendo-os em dNDPs e fazendo com que deixem de estar disponíveis para a reacção seguinte (reacção de extensão de base única). Se o tratamento com SAP falhar, vão estar presentes quantidades excessivas de dNTPs na reacção de iPLEX. Os dNTPs vão interferir com a incorporação dos ddNTPs terminadores, podendo resultar numa maior extensão do *primer* além do local do SNP (polimorfismo de um único nucleótido, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*). Assim, o tratamento SAP é um dos passos chave de todo o ensaio (Sequenom, iPLEX™ Gold Application Guide, 2007) (Figuras 1.7 e 1.8).



**Figura 1.8:** Esquema da manipulação que é feita para adição de SAP às amostras amplificadas.

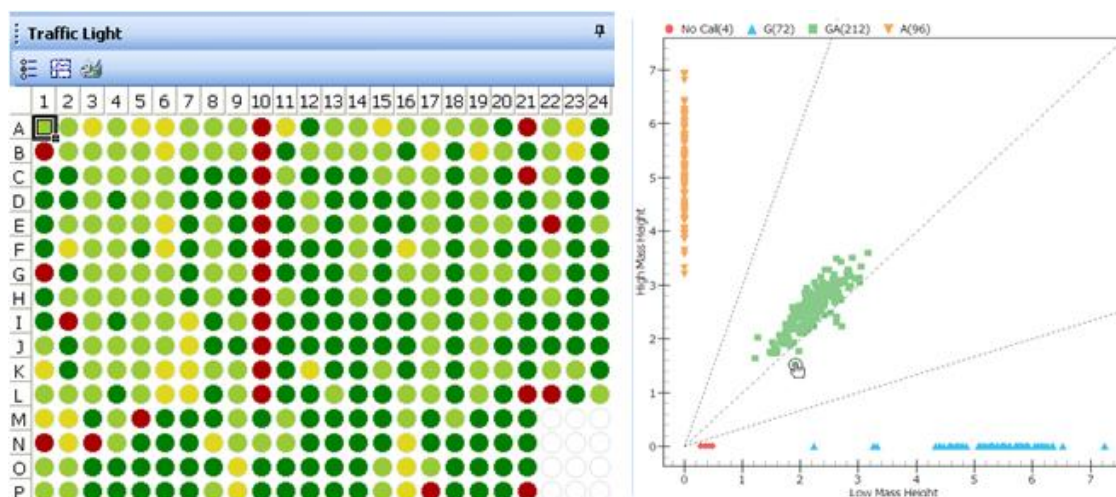
Os *primers* de extensão gerados pelo *software* são utilizados na reacção de extensão de base única (SBE, do inglês *Single Base Extension*). Estes *primers* vão emparelhar na região adjacente ao local do polimorfismo/mutação em estudo e, na reacção de PCR, os ddNTPs vão ser adicionados, fazendo a extensão de apenas 1 base.

De seguida, para remoção de iões de carga positiva (sódio -  $\text{Na}^+$ , potássio -  $\text{K}^+$  e magnésio -  $\text{Mg}^{2+}$ ) é adicionada uma resina catiónica aos produtos de extensão. Este passo é importante para otimizar a análise por espectrometria de massa, visto que se estes iões estiverem presentes, podem originar ruído no espectro (Gabriel *et al.*, 2009).

Os produtos de extensão são depois transferidos para um SpectroCHIP e a detecção dos produtos de extensão é feita através da técnica de MALDI-TOF MS em que cada amostra (spot) é sujeita, em vácuo, a um feixe de laser (Ragoussis *et al.*, 2006). O feixe de laser serve como fonte de dessorção e ionização. As moléculas da matriz absorvem grande parte da energia do laser incidente, minimizando danos na amostra e fragmentação devido à ionização (Gabriel *et al.*, 2009).

As amostras uma vez vaporizadas (dessorvidas) e ionizadas são transferidas electrostaticamente para um espectrómetro de massa que analisa a velocidade a que as moléculas chegam ao detector - “tempo de voo” (*time-of-flight*). As amostras são detectadas individualmente de acordo com a razão massa/carga (Ragoussis *et al.*, 2006; Gabriel *et al.*, 2009).

O sistema de *MassArray* assegura razões sinal-ruído adequadas e picos que são gerados a partir dos produtos de extensão e analisados através da utilização do *software Typer 4.0* (Typer 4.0 User's Guide, Sequenom) (Figura 1.9). Este *software* permite verificar qual a taxa de identificações (*calls*), ou seja, a percentagem de alelos e logo de genótipos que são identificados. Esta taxa de *calls* é idealmente traduzida pelo aparecimento de cor verde na análise da placa de 384 poços (mapa de dados do *chip* na Figura 1.9), que indica um elevado sucesso nas reacções de amplificação e de extensão de base única, logo uma boa percentagem de identificação de genótipos (Oeth *et al.*, 2005; Typer 4.0 User's Guide, Sequenom). A massa dos produtos de extensão indica o alelo presente no local da alteração (mutação ou polimorfismo) analisada (Blondal *et al.*, 2003; Oeth *et al.*, 2005).



**Figura 1.9:** Resultados de *iPLEX MassArray*: à esquerda, encontra-se uma imagem do mapa de dados do *chip*. Cada *spot* corresponde às amostras corridas no ensaio de *iPLEX*. A cor dos poços está associada à taxa de *call*. O *software* compara a taxa de detecção (*call*) com o limiar definido pelo utilizador. Assim, a cor verde escura corresponde a uma elevada taxa de detecção, verde-claro corresponde a uma taxa intermédia de detecção, amarelo uma detecção abaixo do esperado e vermelho as amostras sem detecção. À direita encontra-se a representação gráfica da distribuição de amostras em função da massa dos alelos detectados pelo *software*. A laranja está representado o grupo de amostras que apresentou maior massa (homozigotas), a azul estão as amostras com menor massa (homozigotas) e a verde estão as amostras com massas intermédias (heterozigotas).

Uma vez que a técnica de *iPLEX* não permite a identificação de novas mutações, torna-se relevante a utilização de outra metodologia que permita detectar novas alterações no DNA. Assim, a Desnaturação de Alta Resolução (HRM, do inglês *High Resolution Melting*), uma técnica baseada em PCR em Tempo Real será ideal para complementar a técnica de *iPLEX MassArray* (Santos *et al.*, 2011).

### 1.9 Desnaturação de Alta Resolução (HRM)

A metodologia de HRM tem sido utilizada na detecção de variações em genes, cujas alterações estão associadas ao desenvolvimento de cancro de mama, fibrose quística e também MH (Van der Stoep *et al.*, 2009; Audrezet *et al.*, 2008; Millat *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011).

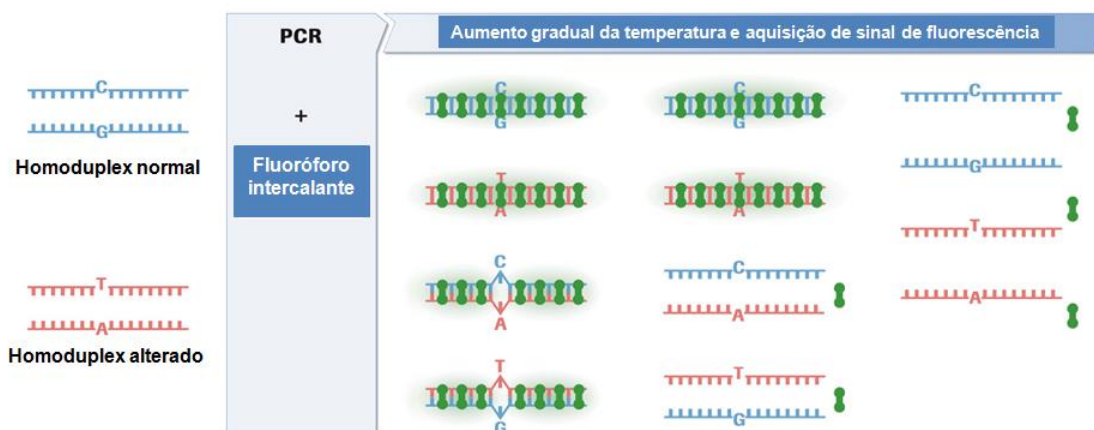
A técnica de HRM, permite a detecção em larga escala de variações (SNPs, metilações, pequenas inserções e deleções) de uma forma rápida, eficiente e a baixo custo, sendo uma técnica de fácil utilização e elevada especificidade e sensibilidade (Taylor, 2009; Vossen *et al.*, 2009; Wittwer, 2009). Uma das maiores aplicações da técnica é o rastreio de sequências de DNA, para detecção de alterações desconhecidas (Erali *et al.*, 2008; Taylor, 2009; Wittwer, 2009; Santos *et al.*, 2011).

O ensaio de HRM começa com a amplificação por PCR de uma sequência alvo, na presença de um fluoróforo saturante (*Resolight Dye*), que apresenta uma fluorescência intensa quando intercalado em DNA de cadeia dupla (Roche Diagnostics – Technical Note No.1). Uma amplificação específica na



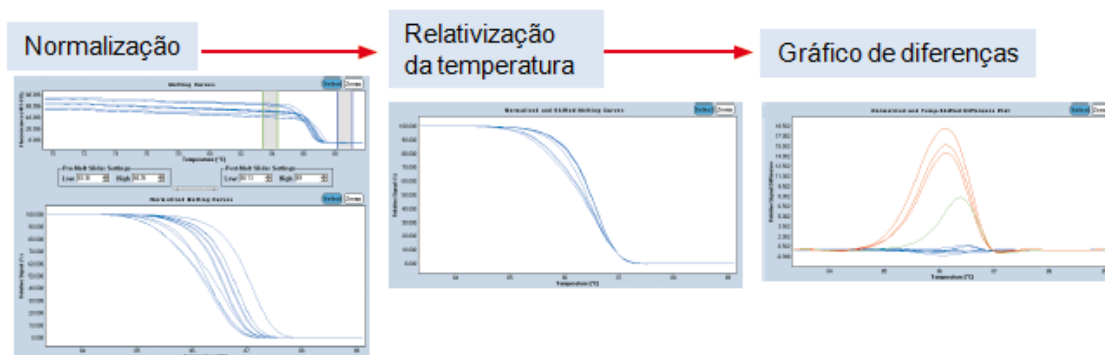
reacção de PCR é essencial para que haja uma correcta análise das amostras, evitando os falsos positivos (Taylor, 2009; Wittwer, 2009).

Após a reacção de PCR em tempo real, os amplicões são brevemente desnaturados e depois rapidamente renaturados. Se a amostra for heterozigótica, irá ocorrer a formação de híbridos complementares entre si (homoduplexes) e de híbridos não complementares (heteroduplexes) (Figura 1.10) (Roche Diagnostics - Light Cycler 480 System Gene Scanning Software).



**Figura 1.10:** Exemplo de uma amostra heterozigótica que origina homo- e heteroduplexes, que irão apresentar diferentes temperaturas de desnaturação. Adaptado de Roche Diagnostics – Technical Note No.1.

Se após este passo de desnaturação/renaturação rápido se for aumentando lentamente a temperatura (com aquisição de fluorescência contínua) é possível obter curvas de desnaturação (Reed *et al.*, 2007). No caso de uma amostra ser homozigótica, o sinal de fluorescência diminui a uma temperatura específica, correspondendo à temperatura de separação dos homoduplexes formados. Em amostras heterozigóticas, o sinal de fluorescência apresenta uma diminuição, que corresponde ao somatório das temperaturas de separação dos homo- e heteroduplexes formados (Figura 1.11) (Roche Diagnostics – Light Cycler 480 System Gene Scanning Software).

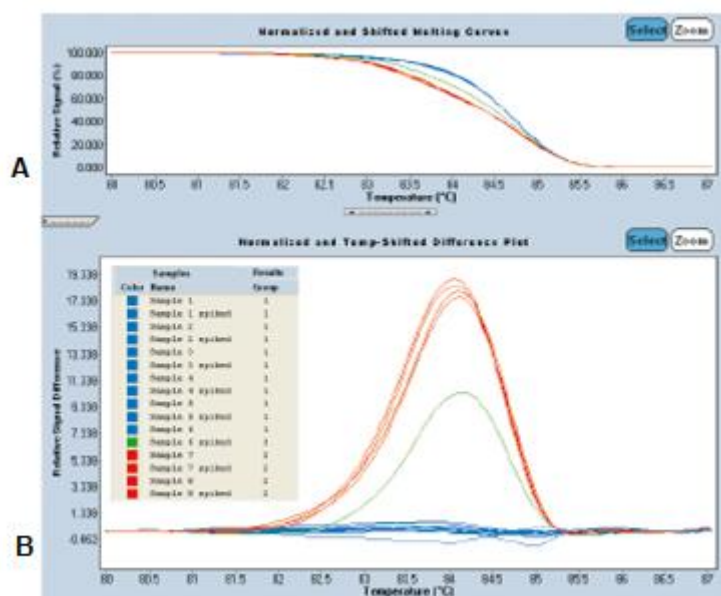


**Figura 1.11:** Sequência de passos efectuados pelo software, para que seja possível identificar diferentes perfis de desnaturação relativamente aos controlos usados. Adaptado de Roche Diagnostics – Technical Note No.1.

Para cada amostra, a variação do sinal de fluorescência adquirido é representada em função da temperatura, originando curvas de desnaturação. As curvas de desnaturação são influenciadas pela dimensão em pares de bases da sequência amplificada e pelo seu conteúdo em GC (Taylor, 2009; Tindall *et al.*, 2009). A partir das curvas de desnaturação são gerados picos de desnaturação únicos, que são depois analisados. A forma da curva de desnaturação de uma amostra homozigótica será diferente da de uma amostra heterozigótica, dado representar o somatório das curvas de desnaturação dos quatro diferentes duplexes formados anteriormente. Os heteroduplexes, como são menos estáveis que os homoduplexes, desnaturam mais rapidamente, influenciando assim a curva de desnaturação da amostra.

O *software* faz a normalização das curvas de desnaturação, originando um gráfico de diferenças (*difference plot*) da variação relativa do sinal de fluorescência em função da temperatura, permitindo assim, a comparação das amostras em análise com as amostras de indivíduos saudáveis, que são colocadas como linha de base (Figura 1.12) (Roche Diagnostics – Light Cycler 480 System Gene Scanning Software).

Sempre que uma amostra apresenta um perfil de desnaturação diferente dos controlos e uma amplitude no gráfico de diferenças relativas fora do intervalo [-2;+2] é considerada como provavelmente alterada. Neste caso a amostra é enviada para sequenciação, para identificação da alteração de DNA que originou o perfil diferente.



**Figura 1.12:** Exemplo da análise de um SNP. **A-** Perfis de desnaturação. **B-** Amostras no gráfico de diferenças. Em ambas as imagens, a vermelho encontram-se as amostras heterozigóticas (heteroduplexes), a azul as amostras homozigóticas normais (ausência de mutação em ambos os alelos) (homoduplexes) e a verde a amostra homozigótica alterada (homoduplexes). Fonte: Roche Diagnostics – Technical Note No.1.

### **1.10 Objectivos do trabalho**

Sendo a MH uma doença com uma prevalência significativa na população em geral, torna-se relevante o seu estudo na população portuguesa. O presente trabalho tem como principais objectivos: 1º a optimização de duas novas metodologias, iPLEX *MassArray* e Desnaturação de Alta Resolução, para o diagnóstico genético de MH; 2º a caracterização das mutações associadas a MH num grupo de 37 doentes da população portuguesa com recurso às técnicas optimizadas no ponto 1 de forma a tentar perceber a distribuição de mutações na amostra populacional em estudo e se esta se assemelha mais à situação dos Estados Unidos da América (EUA) em que cada família tem a sua mutação “privada” ou à situação da China ou da Holanda com mutações fundadoras e prevalentes nestas populações; 3º contribuir para o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo pela integração entre os dados clínicos de cada paciente e os respectivos dados de genotipagem. Espera-se com esta tese contribuir para um diagnóstico genético mais rápido, económico e mais eficiente desta patologia que possa ser utilizado para uma melhoria significativa da prática clínica ao nível do prognóstico.



## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostra populacional em estudo

Foram analisados 37 doentes portugueses (Tabela 2.1) não relacionados entre si, e com diagnóstico clínico ou suspeita de MH. Foram colhidos 6 mililitros (mL) de sangue periférico em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a cada doente e conservados a -20 graus centígrados (°C) (Terumo®) até posterior utilização. Foram igualmente colhidas amostras de sangue periférico de 50 indivíduos sem suspeita ou história familiar de MH, para controlo negativo de mutações. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa e todos os sujeitos de estudo assinaram um consentimento informado.

**Tabela 2.1-** Amostra populacional em estudo e respectivo fenótipo.

Código da amostra	Fenótipo
1; 2; 6; 8; 9; 11; 13-25; 28; 33-35; 44; 46; 51; 53; 60; 63, 64; 71; 129; 157; 158; 168; 241; 242.	Indivíduos com diagnóstico clínico ou suspeita de MH
CS 1-50	Indivíduos saudáveis sem suspeita de MH

### 2.2 Isolamento e quantificação de DNA de 1 mL de sangue total

O DNA foi isolado e purificado, a partir de 1 mL de sangue total, através da utilização do *kit DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA isolado foi quantificado no espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A), confirmando-se também a sua pureza, através das razões entre a absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) e a absorvância a 280 nm ( $A_{280}$ ) e entre a  $A_{260}$  e a absorvância a 230 nm ( $A_{230}$ ). Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) têm um pico de absorvância máximo a 260 nm, enquanto as proteínas apresentam um pico de absorvância máximo a 280 nm e outros contaminantes tais como sais e compostos orgânicos apresentam um máximo de absorvância a 230 nm. Estas razões permitem assim avaliar a contaminação dos ácidos nucleicos com proteínas ( $A_{260}/A_{280}$  inferior a 1,8) e com outros compostos ( $A_{260}/A_{230}$  superior a 2) (Manual de utilização do Nanodrop - NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual - <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf>).

A concentração de DNA (nanograma/microlitro) (ng/ $\mu$ L) de cada amostra pode ser calculada a partir da Lei de Lambert-Beer:

$$[DNA] = \frac{Abs_{260}}{b \times \epsilon}$$

em que  $b$  corresponde ao percurso óptico (centímetros, cm) e  $\epsilon$  corresponde ao coeficiente de extinção molar ( $\mu$ L. $ng^{-1}$ .cm $^{-1}$ ).

Sempre que as amostras apresentavam concentrações de DNA elevadas, realizava-se uma diluição da respectiva concentração para  $10\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ , de forma a manter uma concentração fixa em todas as amostras.

A integridade do DNA foi adicionalmente avaliada através de electroforese unidimensional em gel de agarose a 0,8% (massa/volume; m/v) contendo 2  $\mu\text{L}$  de *Gel/Red* (Biotarget, representante da Biotium, Portugal) (concentração inicial 10.000x; 500  $\mu\text{L}$ ) por cada 100 mL de gel.

### 2.3 Caracterização do polimorfismo de inserção/delecção no intrão 16 do gene *ACE1*

Para os indivíduos analisados, fez-se a caracterização do polimorfismo de inserção/delecção no intrão 16 do gene *ACE1*. Para tal, o DNA dos doentes foi amplificado para a região em estudo com recurso à técnica de PCR num termociclador (Multigene Gradient, Labnet International. Inc.) e utilizando uma polimerase termoestável - *TaqMed DNA Polymerase* (Citomed, representante da Biotium, Portugal). A composição da mistura de reacção de PCR encontra-se descrita na tabela 2.2 e o programa de amplificação utilizado está descrito na tabela 2.3.

**Tabela 2.2:** Composição da mistura de reacção de PCR para a detecção do polimorfismo no intrão 16 do gene *ACE1*.

Componente	Volume	Concentração final
DNA	5 $\mu\text{L}$	50ng/ $\mu\text{L}$
Tampão Hi Specific (5X)	1,5 $\mu\text{L}$	0,5X
<i>TaqMed DNA Polimerase</i> (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,5 $\mu\text{L}$	2,5U/ $\mu\text{L}$
dNTP's (stock: 10mM)	0,3 $\mu\text{L}$	0,2 mM
Tampão (stock: 10X)	1,5 $\mu\text{L}$	1X
MgSO <sub>4</sub> (stock: 20mM)	1,9 $\mu\text{L}$	2,5 mM
<i>Primer</i> (stock: 10 pM)	0,8 $\mu\text{L}$	8 pM
DMSO	0,84 $\mu\text{L}$	5,6%
Água destilada	1,85 $\mu\text{L}$	
	Volume final: 15 $\mu\text{L}$	

X – vezes; U – unidades; mM – milimolar; pM – picomolar;  $\mu\text{L}$  – microlitro.

**Tabela 2.3:** Programa de PCR para a detecção do polimorfismo no intrão 16 do gene *ACE1*.

	Nº de Ciclos	Tempo	Temperatura
Desnaturação inicial	1x	5 min	95 °C
Desnaturação	30x	45 seg	95 °C
<i>Annealing</i>	30x	45 seg	59 °C
Extensão	30x	1 min	72 °C
Extensão final	1x	10 min	72 °C

min – minuto; seg – segundos

Depois da amplificação, as amostras foram sujeitas a electroforese unidimensional em gel de agarose (Citomed, representante da Biotium, Portugal) a 3% (m/v) a 110 Volts (V) durante 1 hora (h). Para a visualização da presença das bandas correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados (inserção (490pb) e/ou delecção (190pb)) foram incorporados no gel de agarose 2 $\mu\text{L}$  do corante

fluorescente *GelRed* (Biotarget, representante da Biotium, Portugal) (concentração inicial 10.000x; 500 µL) por cada 100mL de gel e a aquisição de imagem foi efectuada com o equipamento Kodak AlphaDigiDoc, Alpha Innotech, utilizando o *software* AlphEaseFC (AlphaDigiDoc 1000, Alpha Innotech). Para a identificação da dimensão dos fragmentos observados em gel de agarose, utilizou-se o marcador de pesos moleculares *Hyperladder IV* (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal).

## 2.4 iPLEX MassArray

As amostras de DNA extraídas no ponto 2.2 foram analisadas para 541 mutações em 33 genes associados a MH (tabela 2.4). As mutações analisadas foram seleccionadas de duas bases de dados: HGMD (*Human Gene Mutation Database* – <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) e CardioGenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>) e encontram-se representadas na tabela 2.4.

**Tabela 2.4** – Número de mutações analisadas por iPLEX MassArray em cada um dos genes associados a MH. Retirado de *Human Gene Mutation Database* e CardioGenomics.

Gene	Número de mutações analisadas por iPLEX MassArray	Gene	Número de mutações analisadas por iPLEX MassArray
<i>MYH7</i>	205	<i>FXN</i>	2
<i>MYBPC3</i>	173	<i>MYOZ2</i>	2
<i>TNNT2</i>	35	<i>SLC25A4</i>	2
<i>TNNI3</i>	27	<i>TTN</i>	2
<i>TPM1</i>	13	<i>ACTA1</i>	1
<i>TCAP</i>	10	<i>CASQ2</i>	1
<i>MYL2</i>	9	<i>CAV3</i>	1
<i>PRKAG2</i>	8	<i>LAMP2</i>	1
<i>ACTC1</i>	7	<i>MTTG</i>	1
<i>CSRP3</i>	7	<i>MTTI</i>	1
<i>JPH2</i>	7	<i>MYO6</i>	1
<i>MYL3</i>	6	<i>OBSCN</i>	1
<i>MYLK2</i>	4	<i>PLN</i>	1
<i>MTCYB</i>	3	<i>RAF1</i>	1
<i>MYH6</i>	3	<i>TNNC1</i>	1
<i>COX15</i>	2	<i>VCL</i>	1
<i>DES</i>	2		

A genotipagem das amostras foi efectuada recorrendo à técnica de iPLEX® MassArray, pela utilização do *kit* de iPLEX Gold (Sequenom), que permite a amplificação por PCR das regiões contendo as mutações em estudo, seguida de uma reacção de extensão de um único nucleótido associado à alteração em causa e posterior detecção por espectrometria de massa (MALDI-TOF) no sistema *Sequenom MassArray* (Sequenom, Hamburgo, Alemanha) (Santos *et al.*, 2011). As 541 mutações foram agrupadas em 35 *plexes* (cada *plex* corresponde a um poço numa placa de 384 poços (Sequenom, Hamburgo, Alemanha)) (Santos *et al.*, 2011). O desenho dos *primers* para as reacções de PCR e de extensão de base única foi realizado utilizando o *software* MassARRAY assay

*design 3.1* (Sequenom) (Santos *et al.*, 2011). Foram seguidas as condições experimentais indicadas pelo fabricante (Sequenom, Application Note) e igualmente descritas por Santos e colaboradores (2011) no que respeita: às condições de amplificação por PCR das regiões que flanqueiam as mutações em estudo; ao seu posterior tratamento com fosfatase alcalina de camarão (SAP), para desfosforilação de dNTPs não incorporados; à subsequente reacção de extensão de base única, usando nucleótidos de massa modificada associados a uma mistura terminadora para detecção de cada uma das 541 mutações específicas; à purificação dos produtos de reacção de extensão (limpeza final de sais e reagentes excedentes) usando uma resina catiónica. Os produtos de reacção foram dispensados utilizando um *robot* (*MassArray Nanodispenser*, Sequenom), num *SpectroCHIP* com 384 poços (Figura 1.8). As diferenças de massa dos produtos de extensão foram detectadas por MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) utilizando o sistema *MassArray Workstation* v.3.3 (Sequenom). A análise dos resultados de genotipagem obtidos foi realizada recorrendo ao *software Typer Analyzer* v.4.0.2 (Santos *et al.*, 2011). As mutações identificadas foram posteriormente confirmadas por sequenciação automática (ponto 2.6).

## **2.5 Desnaturação de Alta Resolução (HRM)**

Nas amostras de indivíduos com MH em que não foram detectadas mutações pela técnica de iPLEX *MassArray* ou cujo resultado se apresentou dúvida, foi então realizado um rastreio de mutações em 7 genes associados a MH, por HRM num termociclador que permite realizar PCR em Tempo Real *LightCycler 480®* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Para tal utilizou-se o *kit High Resolution Melting Master* (Roche), que contém o fluoróforo *Resolight Dye* (que intercala em condições saturantes, o DNA em cadeia dupla) e uma mistura reaccional que contém já a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase*, bem como o tampão de reacção e os dNTPs.

Tal como referido anteriormente (ponto 1.9), as amostras de DNA foram inicialmente sujeitas a um passo de amplificação por PCR (os *primers* usados foram os descritos por Marques, 2010), havendo o cuidado dos *primers* utilizados originarem amplicões com dimensões inferiores a 300pb, para aumentar a especificidade na detecção de alterações (Santos *et al.*, resultados não publicados – resumo em anexo). Nos casos em que os exões tinham mais de 315pb, a amplificação foi feita utilizando pares de *primers* sobrepostos, como é o caso do exão 23 do gene *MYBPC3*, exão 22 do gene *MYH7* e exão 7 do gene *MYL2*. Os *primers* escolhidos amplificavam a região do exão, bem como a fronteira intrão/exão e exão/intrão em todos os genes estudados (Tabela 2.5), de modo a permitir a detecção de possíveis mutações de *splicing*.



**Tabela 2.5** - Exões analisados por HRM em cada um dos genes associados a MH. Adaptado de Santos *et al.*, resultados não publicados.

Gene	Exões analisados	Sequência de referência <sup>1</sup>
<i>ACTC1</i>	6	NM_005159
<i>MYBPC3</i>	14	NM_000256
	16	
	17	
	18	
	22	
	23 (1)	
	23 (2)	
	25	
<i>MYH7</i>	30	NM_000257
	5	
	7	
	11	
	13	
	14	
	19	
	20	
	22 (1)	
	22 (2)	
<i>MYL2</i>	23	NM_000432
	7 (1)	
<i>TCAP</i>	7 (2)	NM_003673
	1	
<i>TNNI3</i>	5	NM_000363
	7	
<i>TNNT2</i>	3	NM_000364
	7	
	12	
	14	

<sup>1</sup> - Fonte: UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Foram analisados um total de 26 exões para os 7 genes, tendo sido escolhidos os genes e exões mais frequentemente associados a MH e para os quais se encontram descritas maior número de mutações, bem como aqueles cujas condições estavam totalmente optimizadas (HGMD; Marques, 2010; Santos *et al.* – resultados não publicados).

Após a reacção de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram aquecidos até aos 95°C para desnaturação da cadeia dupla, e depois arrefecidos até aos 40°C para que, por renaturação, se formassem homo- e heteroduplexes. Após esta fase, submeteram-se as amostras a um aumento gradual de temperatura, dos 60°C aos 95°C, com aquisição de fluorescência contínua. As condições reaccionais foram as indicadas nas tabelas 2.6, 2.7 e 2.8.

**Tabela 2.6:** Composição da mistura utilizada no rastreio de alterações do DNA por HRM.

Componente	Volume	Concentração final
DNA	2 µL	10ng/µL
<i>FastStart Taq DNA Polymerase</i>	5 µL	5U/µL
MgCl <sub>2</sub> (stock: 25mM)	0,8 – 1,6 µL	2,0 – 4,0 mM
<i>Primer</i> (stock: 4 mM)	0,5 – 1,25 µL	0,2 – 0,5 mM
Água destilada	0,55 – 1,7 µL	
	Volume final: 10 µL	

**Tabela 2.7:** Condições reaccionais de amplificação por PCR que precedem o passo de HRM.

	Nº de Ciclos	Tempo	Temperatura
Desnaturação inicial	1x	10 min	95 °C
Desnaturação	35x	10 seg	95 °C
Annealing	35x	10 seg	55 °C - 60 °C <sup>a</sup>
Extensão	35x	20 seg	72 °C

<sup>a</sup> Depende da temperatura de emparelhamento (do inglês, *annealing*) dos *primers*.

**Tabela 2.8:** Condições reaccionais do passo de HRM.

Temperatura	Aquisições (por °C)	Duração	Taxa de variação (°C/seg)
95 °C		1 min	4,40
40 °C		1 min	2,20
60 °C – 95 °C		1 seg	1,00
95 °C	25		0,02

Os resultados obtidos foram analisados com o *software LightCycler 480® versão 1.5.0.39 SP3* (Roche). As curvas de desnaturação (representam a perda de fluorescência em função da temperatura durante o passo final de HRM), permitiram identificar perfis de desnaturação distintos entre as amostras controlo (indivíduos saudáveis) e as amostras cuja região amplificada apresentava alterações genéticas. A representação num gráfico (*difference plot*) dos perfis de desnaturação das amostras em estudo, usando como linha de base os perfis de desnaturação das amostras controlo, permitiu claramente identificar as amostras com alterações na sequência de DNA (Figura 1.11).

Em cada ensaio foram utilizadas pelo menos 5 amostras controlo. Quando uma determinada amostra apresentava um perfil de desnaturação diferente dos controlos e valores no *difference plot* fora dos limites do intervalo [-2;+2] foi considerada como provavelmente alterada. Neste caso, e uma vez que a técnica de HRM não nos dá indicação de qual é a alteração ao nível da sequência de DNA, a amostra foi enviada para sequenciação automática (ponto 2.6).

## 2.6 Reacções de PCR, purificação dos respectivos produtos e sua sequenciação

Nas amostras de doentes com MH em que se tenha identificado uma ou mais mutações por iPLEX *MassArray* (ponto 2.4), ou alterações na sequência de DNA por HRM (ponto 2.5), tornava-se imperativo a sua confirmação ou a sua identificação, respectivamente. Para tal, numa primeira fase foi necessário amplificar por PCR as regiões do DNA onde se pretendia confirmar/identificar as mutações/alterações. Estas reacções foram realizadas num termociclador (Multigene Gradient, Labnet International, Inc.) e a síntese de DNA levada a cabo por uma DNA polimerase - *BIOTAQ DNA Polymerase* (Citomed, representante da Bioline, Portugal). A amplificação decorreu segundo as condições apresentadas nas Tabelas 2.9 e 2.10.

**Tabela 2.9:** Composição da mistura de reacção de PCR.

Componente	Volume	Concentração final
DNA	2 µL	10ng/µL
Hi Specific (5X)	1 µL	0,5X
<i>BIOTAQ DNA Polymerase</i>	0,3 µL	5U/µL
dNTP's	2 µL	6 mM
Tampão (stock: 10X)	2 µL	1X
MgCl <sub>2</sub> (stock: 25 mM)	0,4 – 1,6 µL	1,0 – 4,0 mM
<i>Primer</i> (stock: 0,4 mM)	0,8 µL	0,016 mM
Água destilada	11,5 – 10,3 µL	
	Volume final: 20 µL	

**Tabela 2.10:** Condições reaccionais de amplificação por PCR.

	Nº de Ciclos	Tempo	Temperatura
Desnaturação inicial	1x	5 min	94 °C
Desnaturação	35x	30 seg	94 °C
<i>Annealing</i>	35x	1 min	55 °C-60 °C <sup>a</sup>
Extensão	35x	30 seg	72 °C
Extensão final	1x	10 min	72 °C

<sup>a</sup> Depende da temperatura de *annealing* dos *primers*.

Depois da amplificação, as amostras foram submetidas a electroforese unidimensional em gel de agarose (Citomed) a 3% (m/v), contendo 2 µL de *GelRed* (Biotarget) por cada 100 mL de gel, durante 1h a 110V. A dimensão dos fragmentos era verificada através da utilização do marcador de pesos moleculares *Hyperladder IV* (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal). A aquisição de imagem foi efectuada com o equipamento Kodak AlphaDigiDoc, Alpha Innotech, utilizando o *software* AlphEaseFC (AlphaDigiDoc 1000, Alpha Innotech) para verificação da presença da banda específica correspondente ao fragmento pretendido. Sempre que esta condição se verificava, a banda era excisada do gel e purificada através da utilização do kit de purificação *Jetquick Gel Extraction Spin Kit* (Genomed, Lisboa, Portugal).

Os amplicões de DNA purificados foram enviados para sequenciação automática (realizada como colaboração no Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra). Após detecção/confirmação de uma alteração numa direcção de sequenciação (com um dos *primers*), esta era reconfirmada, realizando uma nova amplificação da região em causa e sequenciando na outra direcção (com o outro *primer*). Desta forma, excluíam-se potenciais erros introduzidos pela DNA polimerase sem actividade de correcção de erros. De resalvar no entanto, que a escolha desta enzima em detrimento de outras com actividade de correcção de erros se deveu ao pequeno tamanho de amplicões em estudo e ao facto atrás referido de reconfirmação por sequenciação independente em ambas as direcções. A análise dos cromatogramas obtidos foi efectuada usando o programa *Finch TV versão 1.4.0* (Geospiza Inc., Seattle, EUA). Utilizou-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gratuitamente, para comparação das sequências de DNA das

amostras em estudo com as existentes na base de dados do genoma Humano ([http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/home.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml)), permitindo assim a confirmação das mutações (tais como mutações pontuais, inserções, deleções, estas duas últimas podendo originar *frameshifts* se não forem múltiplos de 3) anteriormente identificadas por iPLEX *MassArray* ou das alterações detectadas por HRM. As alterações identificadas não presentes em bases de dados, quer de mutações (HGMD) quer de polimorfismos (Ensembl) e nunca antes publicadas em revistas científicas foram caracterizadas como potencialmente associadas a MH com base em 4 critérios: 1) realização do seu alinhamento com sequências de outros organismos para verificação do grau de conservação, entre espécies, do resíduo alterado, utilizando a informação disponível na base de dados UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)); 2) análise com a ferramenta PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>), que permite prever o efeito da mutação (que é classificada em relação à severidade de efeitos: benigna, potencialmente maligna ou maligna); 3) estudos populacionais: análise da mutação em causa em 100 cromossomas de indivíduos caucasianos saudáveis; 4) estudos familiares sempre que estes estivessem disponíveis para fornecer amostras de sangue periférico para extracção de DNA e posterior análise da alteração.

### 3- RESULTADOS e DISCUSSÃO

#### 3.1 Polimorfismo de inserção/delecção no intrão 16 do gene *ACE1*

Os 37 indivíduos com diagnóstico clínico de MH foram caracterizados para o polimorfismo de inserção/delecção no intrão 16 do gene *ACE1* (Tabela 3.1), uma vez que este polimorfismo está associado a uma evolução mais rápida da doença e a um aumento do risco de morte súbita em doentes com MH (Doolan *et al.*, 2004; Marian, 2002). Como é possível observar na tabela 3.1, de entre os 37 doentes analisados, 21 são do género masculino e 16 do género feminino. Do total de 37 doentes foram identificados 11 indivíduos com o polimorfismo DD (29,7%), 17 indivíduos com o polimorfismo ID (45,9%) e 9 indivíduos com o polimorfismo menos frequente II (24,3%). Esta distribuição de genótipos está de acordo com o descrito noutros estudos (Lechin *et al.*, 1995; Doolan *et al.*, 2004). Os resultados destes mesmos estudos indicam que a homozigotia para a delecção aumenta o risco de desenvolvimento de hipertrofia extensa em indivíduos com MH, além deste genótipo estar muitas vezes presente em indivíduos com história familiar de morte súbita (Lechin, *et al.*, 1995; Doolan *et al.*, 2004).

**Tabela 3.1:** Polimorfismo de inserção/delecção (I/D) no intrão 16 do gene *ACE1* nos 37 doentes com MH em estudo.

Código da amostra	Género	Polimorfismo do intrão 16 do gene <i>ACE1</i>
1	M	ID
2	M	DD
6	M	DD
8	M	ID
9	F	DD
11	M	II
13	M	ID
14	M	ID
15	M	ID
16	M	DD
17	M	ID
18	F	ID
19	M	DD
20	F	DD
21	F	II
22	F	II
23	F	II
24	F	II
25	M	II
28	F	ID
33	F	II
34	F	ID
35	M	DD
44	M	ID
46	M	DD
51	M	DD
53	M	ID
60	M	II

63	F	ID
64	F	II
71	M	DD
129	M	DD
157	F	ID
158	F	ID
168	M	ID
241	F	ID
242	F	ID

II – homozigotia para a inserção; ID – heterozigotia inserção/delecção; DD – homozigotia para a delecção

No entanto, e apesar do gene *ACE1* ser considerado um gene modificador, que pode alterar a expressão fenotípica da doença, o que justifica, em parte, a variabilidade de fenótipos, a sua influência depende da mutação causadora de MH (Lechin *et al.*, 1995; Marian, 2002; Tesson *et al.*, 1997). A discussão destes resultados será integrada ao longo dos próximos capítulos desta secção de resultados e discussão.

### 3.2 Resultados de iPLEX MassArray

Utilizando a metodologia de iPLEX MassArray foram analisados 37 doentes com diagnóstico clínico indicativo de MH ou com antecedentes familiares da doença, para 541 mutações em 33 genes sarcoméricos e não sarcoméricos (Santos *et al.*, 2011). Após verificação dos gráficos obtidos no ensaio de iPLEX, fez-se uma triagem daqueles que apresentavam extensões adequadas e uma clara separação das amostras em grupos distintos (Figura 1.9), identificados por diferentes símbolos e cores, uma vez que essa condição seria um bom indicador de presença da alteração em estudo.

Assim, seguindo estes critérios, 25 das 37 amostras apresentaram pelo menos uma mutação. Estas amostras foram amplificadas por PCR, para que, por sequenciação, fosse possível confirmar a alteração detectada. No entanto, e devido à dificuldade de optimização das condições de amplificação por PCR para todos os exões e regiões fronteira intrão-exão e exão-intrão dos genes analisados ou mesmo por atrasos na sequenciação, apenas foi possível confirmar os resultados para 8 dos 25 doentes.

**Tabela 3.2:** Resultados obtidos por iPLEX MassArray e confirmados por sequenciação.

Amostra	Gene	Exão	Alteração nucleotídica	Tipo de mutação	Alteração na proteína	Genotipagem iPLEX MassArray	Resultado de Sequenciação
11	TNNT2	14	c.779 A>G	Mutação pontual	Lys260Arg	GA, GA	Confirma resultado de iPLEX MassArray
21	TNNT2	14	c.779 A>G	Mutação pontual	Lys260Arg	GA, GA	Confirma resultado de iPLEX MassArray
6	TNNT2	14	c.779 A>G	Mutação pontual	Lys260Arg	No Call, GA	Confirma resultado de iPLEX MassArray
33	TNNI3	7	c.470 C>T	Mutação pontual	Ala157Val	CT, CT	Mutação diferente (c.521 A>T; p.Lys174Met) - NOVA
19	MYH7	11	c.958 G>A	Mutação pontual	Val320Met	A, A	Confirma alteração de iPLEX MassArray, mas mostra heterozigotia

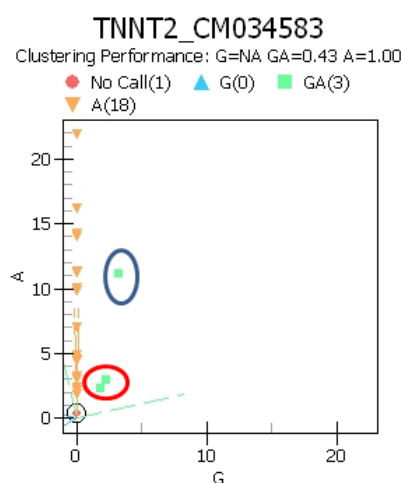
158	MYH7	13	c.1231 G>A	Mutação pontual	Val411Ile	G, GA	Mutação diferente (c.1252 C>A; p.Gln418Lys) - NOVA
28	MYH7	14	c.1354 G>A	Mutação pontual	Arg453His	No Call, GA	Confirma resultado de iPLEX MassArray
168	MYBPC3	23	c.2426 G>A	Mutação pontual	Arg809His	No Call, GA	Mutação diferente (c.2470 C>A; p.Leu824Met) - NOVA

A – adenina; T – timina; C- citosina; G – guanina; Lys – lisina; Arg – arginina; Glu – glutamato; Asp – asparagina; Ala – alanina; Val – valina; Met – metionina; Ile – isoleucina; His – histidina; No call – sem identificação de resultado.

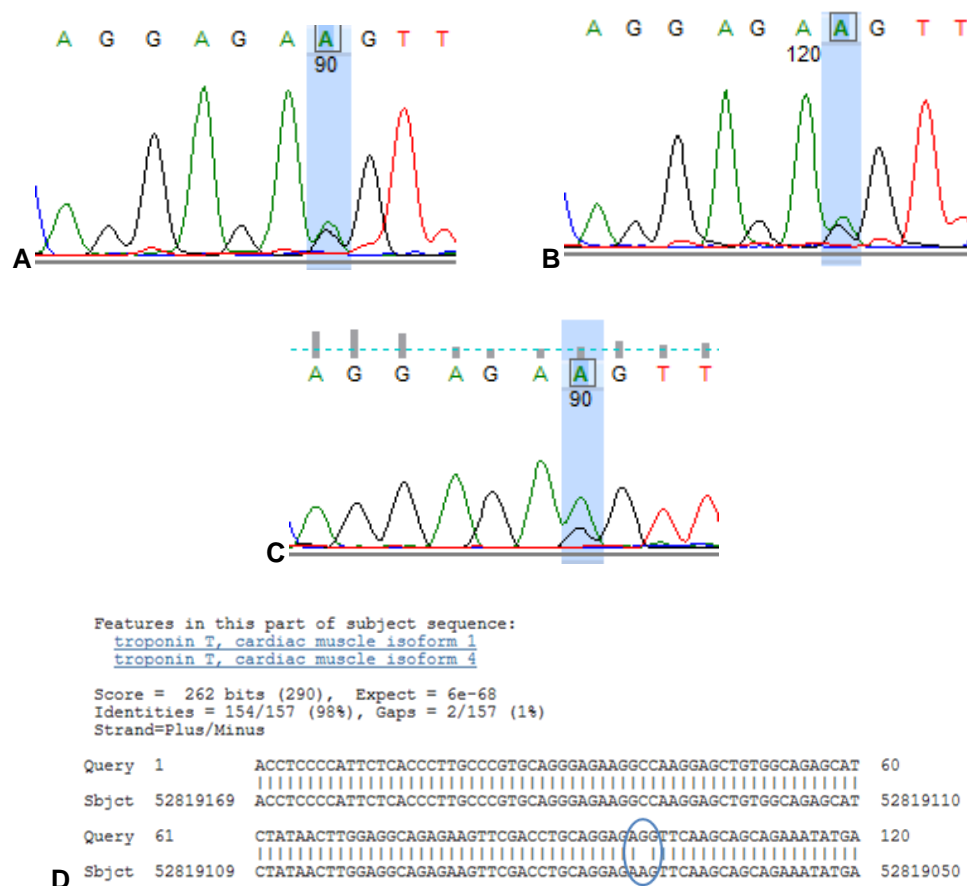
Depois desta breve descrição dos resultados obtidos na genotipagem por iPLEX MassArray, torna-se importante fazer a análise mais detalhada de cada um dos resultados.

### 3.2.1 Alterações detectadas no gene *TNNT2*

No gene *TNNT2* foram detectadas e confirmadas, por sequenciação, alterações em 3 doentes. Todas as alterações se encontram no exão 14 do gene referido, que até à data apresenta 2 mutações e 2 polimorfismos descritos (Cardiogenomics - [http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/muts/TNNT2\\_mutations\\_TOC.html](http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/muts/TNNT2_mutations_TOC.html)). Os 3 indivíduos (11, 21 e 6) apresentaram a mesma alteração (c.779 A>G; p.Lys260Arg), cujo resultado foi confirmado por sequenciação (Figuras 3.1 e 3.2).



**Figura 3.1:** Genotipagem por iPLEX MassArray, para a alteração c.779 A>G, p.Lys260Arg no gene *TNNT2*. Observa-se um grupo principal de amostras (triângulos laranjas invertidos), que apresentam o alelo A (*wild type*) na posição 779 da sequência de nucleótidos. Afastado desse grupo e assinalado com uma oval azul, encontra-se um quadrado verde que corresponde ao doente 6 e dentro da oval vermelha encontram-se dois quadrados verdes que correspondem aos doentes 11 e 21. Todos eles apresentam alteração de A para G naquela posição numa das cadeias de DNA, correspondendo à mutação c.779 A>G em heterozigotia.

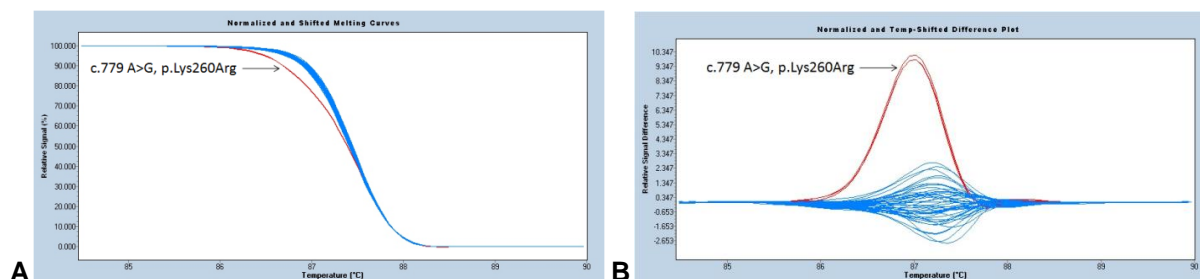


**Figura 3.2:** Caracterização da alteração c.779 A>G, p.Lys260Arg no exão 14 do gene *TNNT2*. **A-** Sequenciação da amostra 11. **B-** Sequenciação da amostra 21. **C-** Sequenciação da amostra 6. Assinalado a azul encontra-se a sobreposição dos picos de adenina (A) e guanina (G), que definem a heterozigotia. **D-** Alinhamento da sequência de DNA da amostra 21, onde se identifica a substituição de A por G, que origina a mutação c.779 A>G, p.Lys260Arg no exão 14 do gene *TNNT2* (NCBI, BLASTn - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A alteração de um aminoácido (a.a) básico e hidrofílico (lisina) por outro resíduo com as mesmas características (arginina), provavelmente não levará a alterações na conformação nem na função da proteína. No entanto, apenas estudos funcionais poderiam confirmar esta hipótese.

Apesar das alterações no gene *TNNT2* estarem associadas a um prognóstico maligno e a um elevado risco de morte súbita (Michels *et al.*, 2009; Morimoto, 2008; Brito e Madeira, 2005), esta alteração (c.779 A>G, p.Lys260Arg) está descrita como sendo um polimorfismo, uma vez que a heterozigotia A/G está presente em 1,7% da população europeia (Ensembl - <http://www.ensembl.org/index.html>). No estudo populacional efectuado para 50 indivíduos saudáveis caucasianos Portugueses, 3 apresentaram a alteração em heterozigotia c.779 A>G, p.Lys260Arg, mostrando que se trata igualmente de um polimorfismo pouco frequente (3%, apesar de superior (2x) ao descrito na população europeia) na população de saudáveis analisada (Figura 3.3).





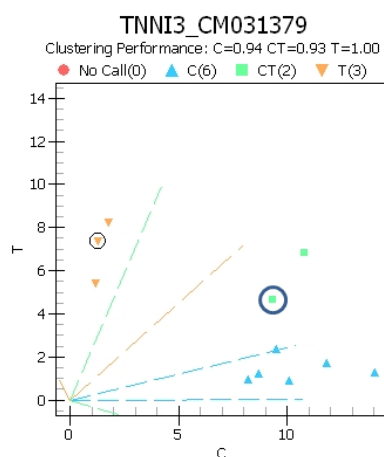
**Figura 3.3** - Estudo populacional (indivíduos saudáveis caucasianos) efectuado para o exão 14 do gene *TNNT2*. **A-** Representado a vermelho encontram-se os perfis de desnaturação das 3 amostras que apresentaram alteração. **B-** *Difference plot* das amostras em estudo, sendo que a azul estão representadas as amostras que não apresentaram alteração e a vermelho estão as amostras que se apresentaram alteradas, tendo uma diferença relativa de sinal de +10.

Os resultados obtidos para o polimorfismo no gene *ACE1*, mostram que 2 dos indivíduos com MH (11 e 21) são homozigóticos para a inserção (II) (Tabela 3.1), pelo que, não deverão estar sujeitos a um maior risco de morte súbita do que qualquer outro doente com a mesma mutação em *TNNT2*. Já o indivíduo 6 é homozigótico para a deleção (DD) no intrão 16 do gene *ACE1* (tabela 3.1), pelo que poderá ter um risco acrescido de morte súbita (Marian, 2002), relativamente aos restantes indivíduos com a mesma alteração.

Os resultados do estudo populacional realizado, mostram que a alteração c.779 A>G, p.Lys260Arg está presente em 3% dos indivíduos saudáveis, apresentando uma frequência semelhante à observada nos indivíduos com MH. Assim, é bastante possível que este polimorfismo não seja, por si só, o responsável pelo desenvolvimento de MH nestes doentes.

### 3.2.2 Alteração detectada no gene *TNNI3*

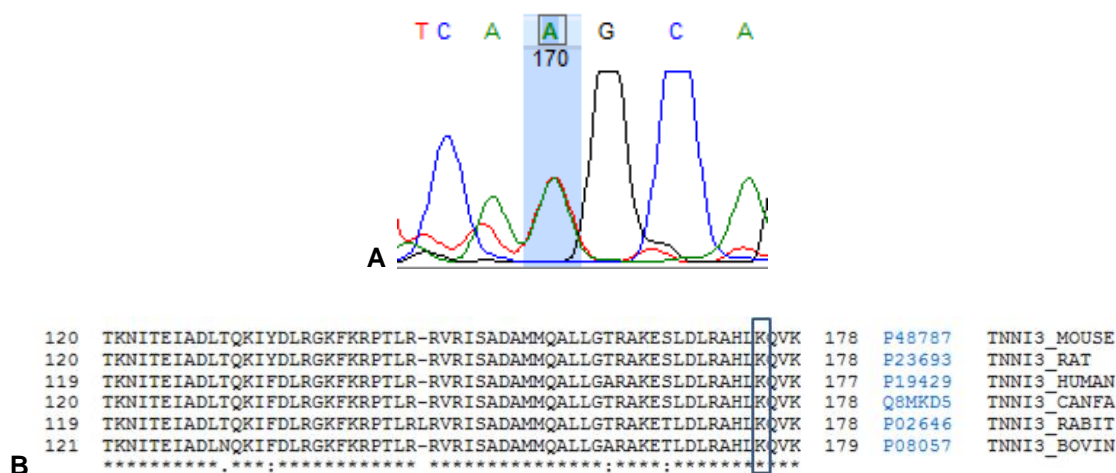
Relativamente ao gene que codifica para a troponina I – *TNNI3* - foi detectada por iPLEX *MassArray* uma alteração c.470 C>T, p.Ala157Val em heterozigotia no exão 7, para o indivíduo 33 (Figura 3.4).

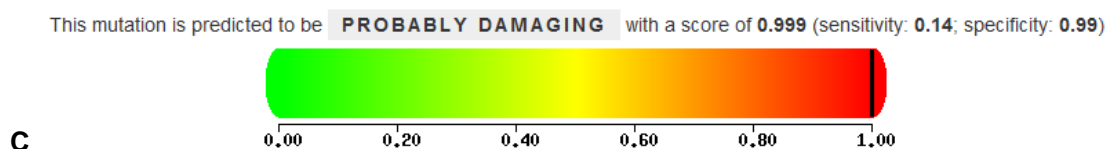


**Figura 3.4:** Genotipagem por iPLEX MassArray, em que o quadrado verde dentro do círculo azul corresponde à amostra 33 identificada como heterozigótica para a mutação c.470 C>T; p.Ala157Val, no exão 7 do gene *TNNI3*. Os triângulos laranjas invertidos correspondem às amostras identificadas como homozigóticas para o alelo T (alelo mutante) e os triângulos azuis correspondem às amostras identificadas como homozigóticas para o alelo C (alelo normal).

Apesar do gráfico apresentar uma boa extensão, as amostras heterozigóticas não se encontram muito separadas das homozigóticas normais, o que poderia ser um indicador de se tratar de um resultado falso positivo. Para além deste facto, uma das amostras identificada como homozigótica para T corresponde ao controlo negativo (água - assinalada na Figura 3.4 com um círculo preto à volta do triângulo laranja invertido) e o resultado proveniente da sequenciação de uma das outras duas amostras homozigóticas veio negativo confirmando tratar-se de um falso positivo.

Assim, quando se procedeu à sequenciação da amostra 33 verificou-se que o resultado de sequenciação não era coincidente com o de iPLEX MassArray confirmando-se as suspeitas iniciais de que o *primer* de extensão não estaria a funcionar correctamente no *plex* respectivo e tendo, portanto, que ser redesenhado para a detecção efectiva desta mutação. No entanto, foi identificada uma alteração em heterozigotia de A para T na posição nucleotídica 521 (p.Lys174Met) tal como se pode observar na Figura 3.5A. Esta alteração não se encontra em nenhuma base de dados, uma vez que não foi ainda descrita, tornando-se relevante a sua caracterização. Assim, fazendo o alinhamento dos a.a que compõem a troponina I, para várias espécies de mamíferos, podemos verificar que a lisina é um a.a altamente conservado (Figura 3.5B). Além disso, trata-se de um a.a hidrofílico, pelo que a sua substituição por um a.a hidrofóbico, como é o caso da metionina, provavelmente levará a mudanças na conformação da proteína, bem como a alterações de função. Por estas razões, esta mutação é prevista como tendo um efeito provavelmente prejudicial, tal como descrito na análise efectuada pelo *software* Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) (Figura 3.5C).





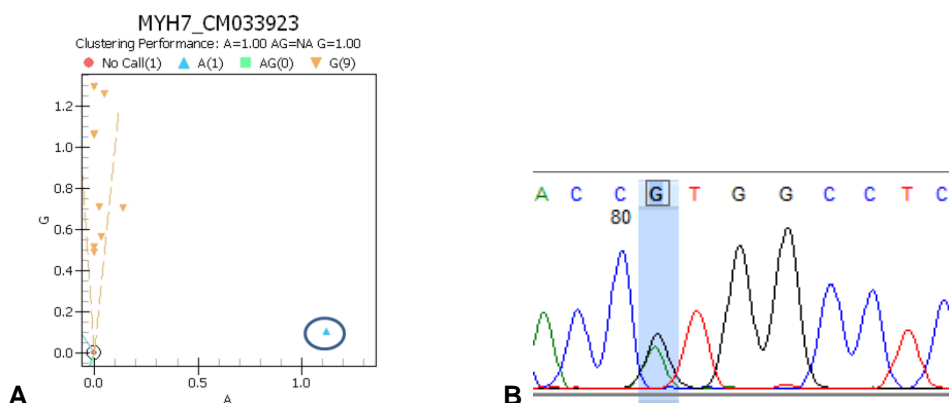
**Figura 3.5:** Caracterização da mutação c.521 A>T, p.Lys174Met, identificada na amostra 33, para o exão 7 do gene *TNNI3*. **A-** Cromatograma da amostra 33, em que a barra azul assinala o local de sobreposição de picos de A e T no nucleótido 521. **B-** Alinhamento da sequência de DNA que mostra a conservação do resíduo de lisina na posição 174 da troponina I. A caixa azul mostra o aminoácido que fica alterado na mutação c.521 A>T, p.Lys174Met (MOUSE- *Mus musculus*, RAT- *Rattus norvegicus*, HUMAN- *Homo sapiens*, CANFA- *Cannis familiaris*, RABIT - *Oryctolagus cuniculus* e BOVIN- *Bos taurus*). Fonte: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). **C-** Análise do PolyPhen-2, em que a mutação é prevista como provavelmente prejudicial. Fonte: <http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>.

Este doente apresenta uma homozigotia para a inserção (II) no gene *ACE1* e uma MH esporádica, que pode dever-se à mutação identificada (c.521 A>T, p.Lys174Met), visto que se situa na região C-terminal, que corresponde ao domínio essencial de sensibilidade ao cálcio (Bonne *et al.*, 1998; Finn *et al.*, 2010). No entanto, é necessário realizar estudos funcionais para que, futuramente se clarifique esta situação.

### 3.2.3 Alterações detectadas no gene *MYH7*

No gene que codifica para a cadeia pesada  $\beta$  da miosina – *MYH7*- foram detectadas 3 alterações por iPLEX *MassArray*, uma no exão 11, uma no exão 13 e uma no exão 14. Na amostra 19 foi detectada no exão 11 uma alteração em homozigotia - c.958 G>A; p.Val320Met (Figura 3.6A). Por seu lado, na amostra 158, foi detectada no exão 13 a alteração c.1231 G>A; p.Val411Ile em heterozigotia e, finalmente na amostra 28, detectou-se também em heterozigotia a alteração c.1354 G>A; p.Arg453His, no exão 14 do gene *MYH7*.

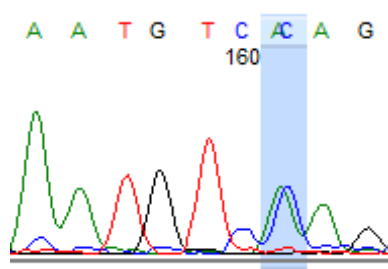
Após confirmação por sequenciação (Figura 3.6B), verificou-se que a amostra 19 apresentava uma heterozigotia para a mutação descrita e não uma homozigotia, podendo tratar-se este resultado de um artefacto ao nível da sensibilidade da técnica de iPLEX *MassArray*.



**Figura 3.6:** **A** – Genotipagem por iPLEX MassArray, para a alteração c.958 G>A; p. Val320Met no gene *MYH7*. O gráfico apresenta uma extensão razoável e uma clara separação das amostras em grupos distintos. Observa-se um grupo principal (triângulos laranjas invertidos), em que as amostras são identificadas como tendo o alelo G (*wild type*) na posição 958 da sequência nucleotídica. Afastado desse grupo e assinalado com uma oval azul, encontra-se um triângulo azul que corresponde à amostra 19, detectada como sendo homozigótica para a mutação c.958 G>A, situada no exão 11 do gene *MYH7*. **B**- Cromatograma em que a barra azul assinala o local de sobreposição de picos de adenina e guanina, mostrando a alteração c.958 G>A em heterozigotia.

Pode pensar-se que a alteração da valina, na posição 320, pela metionina não produz alterações muito significativas na conformação da proteína produzida, uma vez que se tratam de dois a.a apolares. No entanto, uma vez que se trata de uma alteração na cadeia pesada  $\beta$  da miosina, que como foi referido tem um prognóstico maligno devido ao aparecimento precoce da doença (Bashyam *et al.*, 2003; Fatkin e Graham, 2002), e desta mutação se situar na região amino-terminal da proteína, que corresponde ao domínio motor (Bonne *et al.*, 1998; Finn *et al.*, 2010), a mutação pode ter efeitos adversos graves. No entanto, apenas a realização de estudos funcionais poderá esclarecer os efeitos desta alteração. Além disso, a amostra 19 é homozigótica para a deleção (DD) no intrão 16 do gene *ACE1* (Tabela 3.1), fazendo com que tenha um maior risco de morte súbita associado, podendo esta condição funcionar como agravante nos efeitos da mutação.

Para a amostra 158, tal como foi referido anteriormente, foi detectada a alteração c.1231 G>A; p.Val411Ile. No entanto, após sequenciação da região em causa, não se confirmou a presença dessa alteração. Contudo, foi detectada a alteração, não descrita em bases de dados, e como tal não analisada no *chip*, em heterozigotia c.1252 C>A; p.Gln418Lys, também no exão 13 do gene *MYH7* (Figura 3.7).



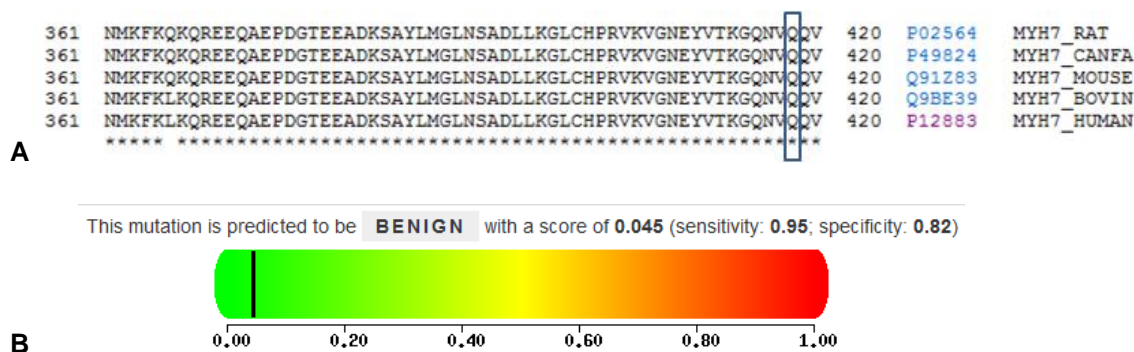
**Figura 3.7:** Cromatograma em que a barra azul assinala a sobreposição de picos de A e C, evidenciando a heterozigotia para a alteração c.1252 C>A para a amostra 158, no exão 13 do gene *MYH7*.

Uma das explicações plausíveis para novamente se ter um falso positivo mas com uma mutação na vizinhança prende-se com o facto desta mutação se situar na região de hibridação do *primer* de

extensão, podendo desta forma alterar a eficiência do emparelhamento e originando um falso positivo.

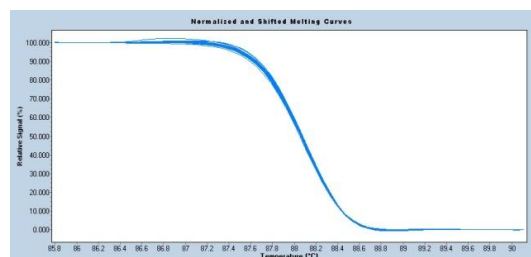
Tendo em conta que este doente sofreu uma síncope cardíaca e que no ensaio de iPLEX *MassArray* não foram identificadas mais mutações, torna-se importante caracterizar a nova alteração que foi detectada (Figura 3.8).

Assim, alinhando os a.a que constituem a cadeia pesada  $\beta$  da miosina, para várias espécies de mamíferos, é possível verificar que a glutamina é um a.a altamente conservado (Figura 3.8A). Seria de esperar que a alteração de um a.a que não tem carga e que tende a formar ligações de hidrogénio, como é o caso da glutamina, por outro a.a que tem carga positiva, como é o caso da lisina tivesse efeitos prejudiciais. Para além disso, a alteração situa-se numa região de ligação à actina (Bonne *et al.*, 1998). No entanto, a alteração é prevista como sendo benigna (Figura 3.8B), muito provavelmente devido ao facto da proteína ser muito grande, acabando o efeito da carga positiva da lisina por ser pouco significativo. A realização de estudos funcionais torna-se necessária no sentido de esclarecer os verdadeiros efeitos desta alteração.



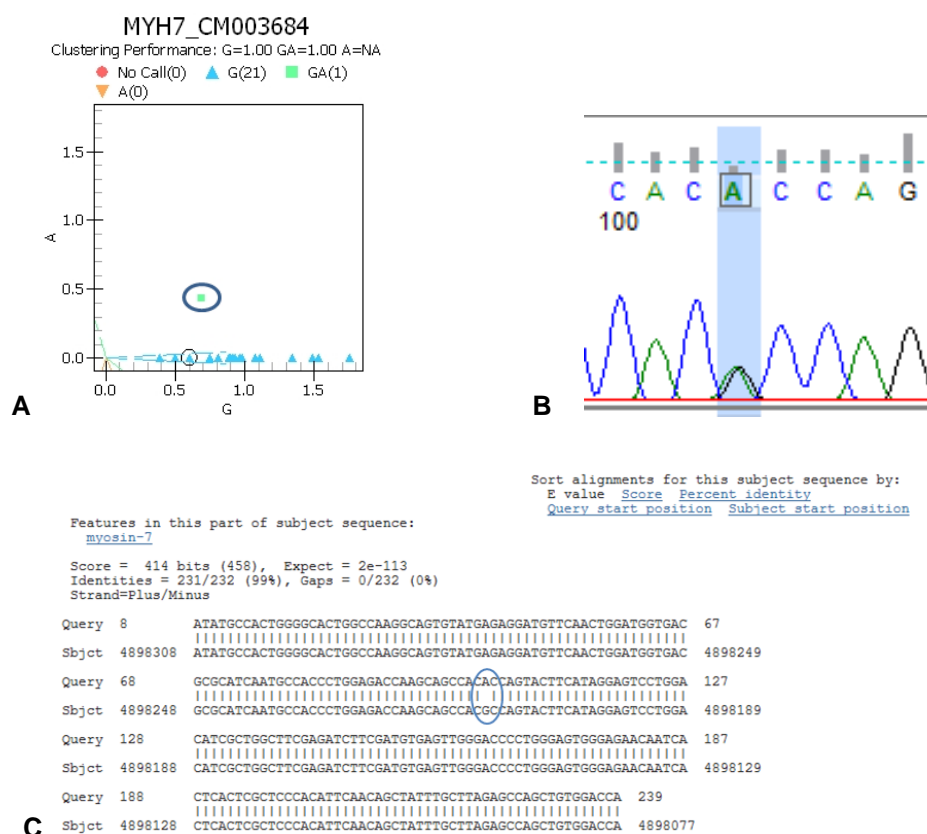
**Figura 3.8:** Caracterização da mutação c.1252 C>A, p.Gln418Lys, no exão 13 do gene *MYH7* na amostra 158. **A-** Alinhamento que mostra a conservação do resíduo de glutamina na posição 418 da cadeia pesada  $\beta$  da miosina. A caixa azul mostra o aminoácido alterado na referida mutação. (RAT- *Rattus norvegicus*, CANFA- *Cannis familiaris*, MOUSE- *Mus musculus*, BOVIN- *Bos taurus*, HUMAN- *Homo sapiens*,). Fonte: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). **B-** Análise do PolyPhen-2, em que a mutação é prevista como benigna. Fonte: <http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>.

Tendo em conta que no exão 13 do gene *MYH7* se encontram descritos um polimorfismo e 13 mutações (ENSEMBL; HGMD), realizou-se um estudo populacional, com 50 indivíduos saudáveis. Como é possível observar na figura 3.9, não se detectaram alterações em nenhum dos indivíduos analisados, pelo que a alteração detectada no doente 158 poderá ser, de facto, uma mutação associada a MH.



**Figura 3.9:** Perfis de desnaturação relativos ao estudo populacional efectuado para o exão 13 do gene *MYH7*.

Para a amostra 28 foi detectada, no exão 14 do gene *MYH7*, a alteração c.1354 G>A; p. Arg453His em heterozigotia, por iPLEX MassArray. O resultado de sequenciação confirmou a mutação detectada no ensaio de iPLEX MassArray (Figura 3.10).



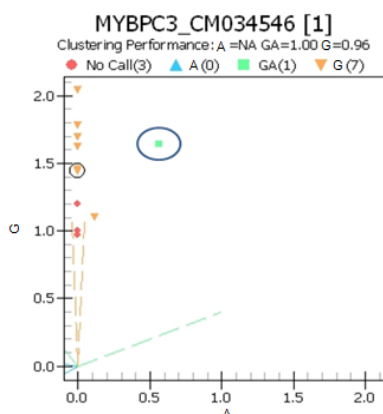
**Figura 3.10:** **A** – Genotipagem por iPLEX MassArray, para a alteração c.1354 G>A; p. Arg453His situada no exão 14 do gene *MYH7*. Observam-se dois grupos distintos de amostras: um grupo principal (triângulos azuis), em que as amostras possuem o alelo G (*wild type*) na posição 1354 da sequência nucleotídica do gene *MYH7*; e a amostra 28 (oval azul com um quadrado verde no interior) detectada como sendo heterozigótica para a mutação referida. **B**- Cromatograma com a sequenciação da amostra 28 evidenciando a sobreposição de picos de A e G. **C** – Alinhamento da sequência obtida em B, em que se encontra assinalada a azul a substituição de um G por um A,

levando à mutação c.1354 G>A; p.Arg453His, no exão 14 do gene *MYH7* (NCBI, BLASTn - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A alteração c.1354 G>A; p. Arg453His situa-se no local de ligação do ATP à cadeia pesada  $\beta$  da miosina (Bashyam *et al.*, 2003; Fatkin e Graham, 2002) (ponto 1.4.1.1.1) e encontra-se descrita como tendo um prognóstico maligno associado devido ao aparecimento precoce da doença e ao elevado risco de morte súbita (Michels *et al.*, 2009; Morimoto, 2008). Uma vez que o doente apresenta heterozigotia (ID) para o polimorfismo no gene *ACE1*, não terá um maior risco de morte súbita associado relativamente a outro doente com a mesma alteração (tabela 3.1).

### **3.2.4 Alteração detectada no gene *MYBPC3***

No gene *MYBPC3* foi detectada a alteração c.2426 G>A; p.Arg809His, em heterozigotia, no exão 23 para a amostra 168, como é possível observar na figura 3.11.



**Figura 3.11:** Genotipagem por iPLEX *MassArray*, para a alteração no gene *MYBPC3*. Observa-se um grupo principal (triângulos laranjas invertidos), em que as amostras são identificadas como tendo o alelo G (*wild type*) na posição 2426 da sequência nucleotídica. Afastado desse grupo e assinalado com círculo azul, encontra-se um quadrado verde que corresponde à amostra 168, detectada como heterozigótica para a mutação c.2426 G>A, situada no exão 23 do gene *MYBPC3*. Pode observar-se que a maioria das amostras analisadas para esta alteração apresenta homozigotia para o alelo normal (G).

O resultado de sequenciação não corrobora o de iPLEX *MassArray*, mas detecta uma substituição de C por A na posição 2470 da sequência nucleotídica, que leva à alteração do a.a de Leu824Met (Figura 3.12). Esta alteração também não se encontra descrita na base de dados, pelo que neste *chip* não seria possível a sua detecção/identificação através da técnica de iPLEX *MassArray*. Assim, torna-se necessária a sua caracterização (Figura 3.13).







detectada no doente 168 pode assim justificar a miocardiopatia apresentada pelo indivíduo, apesar do risco de morte súbita associado ao polimorfismo de inserção/delecção do gene *ACE1* não ser superior (uma vez que é heterozigota (ID)) a qualquer outro indivíduo com aquela mutação no gene *MYBPC3* (tabela 3.1).

A técnica de iPLEX *MassArray* é muito sensível, permitindo a detecção de mutações por inserção, delecção e substituição de uma ou mais bases nucleotídicas. No entanto, os resultados obtidos mostram que, apesar de permitir detectar mutações conhecidas para uma determinada amostra, ainda apresenta necessidade de optimização não só ao nível dos *primers* de amplificação, dado que nalguns *plexes* não se verificou a amplificação inicial do DNA da amostra, mas também ao nível dos *primers* de extensão que em muitas das situações detectam alterações que depois não se comprovam posteriormente por sequenciação, originando alguns resultados falsos positivos. Estes fenómenos podem dever-se quer ao desenho inapropriado de apenas um *primer*, que afecte toda a eficiência do *plex*, quer ao desenho inapropriado de mais do que um *primer*, sendo neste caso necessário redesenhar não só os *primers* utilizados, mas optimizar as reacções *multiplex*, passando por outra combinação de *primers*. No entanto, nalgumas situações de falsos positivos constatou-se que possivelmente o *primer* de extensão não emparelhou correctamente na sequência alvo, por existir uma mutação não descrita nessa zona de emparelhamento, dando assim um resultado positivo devido à massa final ser distinta da massa do fragmento com o alelo normal. As novas alterações identificadas não poderiam ser detectadas pela genotipagem por iPLEX *MassArray*, visto que esta técnica apenas detecta mutações conhecidas e presentes nas bases de dados. No entanto, as alterações descritas pela 1ª vez neste trabalho, poderão ser incluídas na próxima série de ensaios de iPLEX *MassArray*.

### **3.3 Resultados de HRM**

Através da utilização da metodologia de HRM, foram analisados 26 exões em 7 genes (*ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *TCAP*, *TNNI3* e *TNNT2*) para os 37 indivíduos com diagnóstico clínico de MH (ponto 2.5). No sentido de verificar a sensibilidade da metodologia de HRM, este grupo de 37 indivíduos incluiu também aqueles cuja alteração já tinha sido confirmada por sequenciação. Assim, dos 37 indivíduos analisados, 78,4% (29 indivíduos) apresentaram diferenças no perfil de desnaturação e no *difference plot*, e em 15 desses doentes a respectiva alteração já se encontra confirmada por sequenciação.

Após esta breve descrição dos resultados obtidos por HRM, torna-se importante fazer a análise mais detalhada de cada um dos resultados.

### 3.3.1 Alterações detectadas no gene *TNNT2*

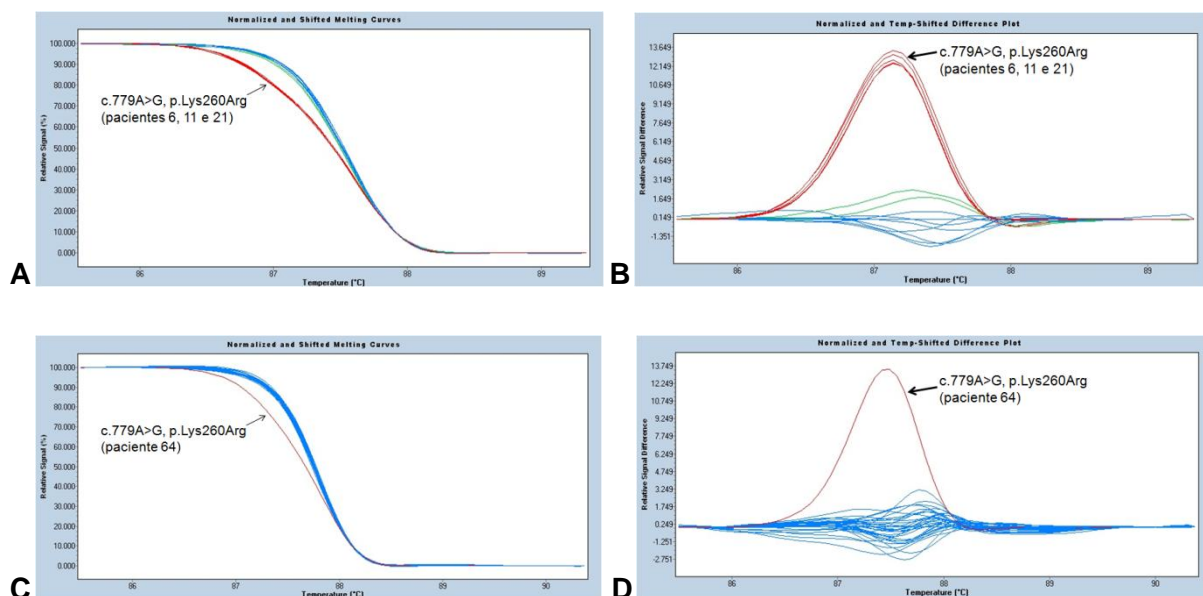
Para o gene *TNNT2* foram detectadas alterações em todos os exões estudados (tabela 2.5). Todas as alterações detectadas e confirmadas por sequenciação para o gene que codifica para a troponina T cardíaca encontram-se sumarizadas na tabela 3.3.

**Tabela 3.3:** Amostras com alterações detectadas no gene *TNNT2* e confirmadas por sequenciação.

Amostra	Exão	Tipo de mutação	Perfil de Desnaturação	Resultado de Sequenciação
6	14	Mutação pontual	Diferente (+11,8)	c.779A>G, p.Lys260Arg
11	14	Mutação pontual	Diferente (+12,1)	c.779A>G, p.Lys260Arg
21	14	Mutação pontual	Diferente (+12,2)	c.779A>G, p.Lys260Arg
64	14	Mutação pontual	Diferente (+13,7)	c.779A>G, p.Lys260Arg
25	14	Mutação de <i>splicing</i>	Diferente (-3,5)	c.801+11 A>G – nova
241	12	Mutação intrónica	Diferente (-6,5)	c.600+65 T>A – nova
17	3	Mutação sinónima	Diferente (+12,8)	c.48G>A, p.Gln16Gln

A sequência de referência usada foi NM\_000364 (Fonte: UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

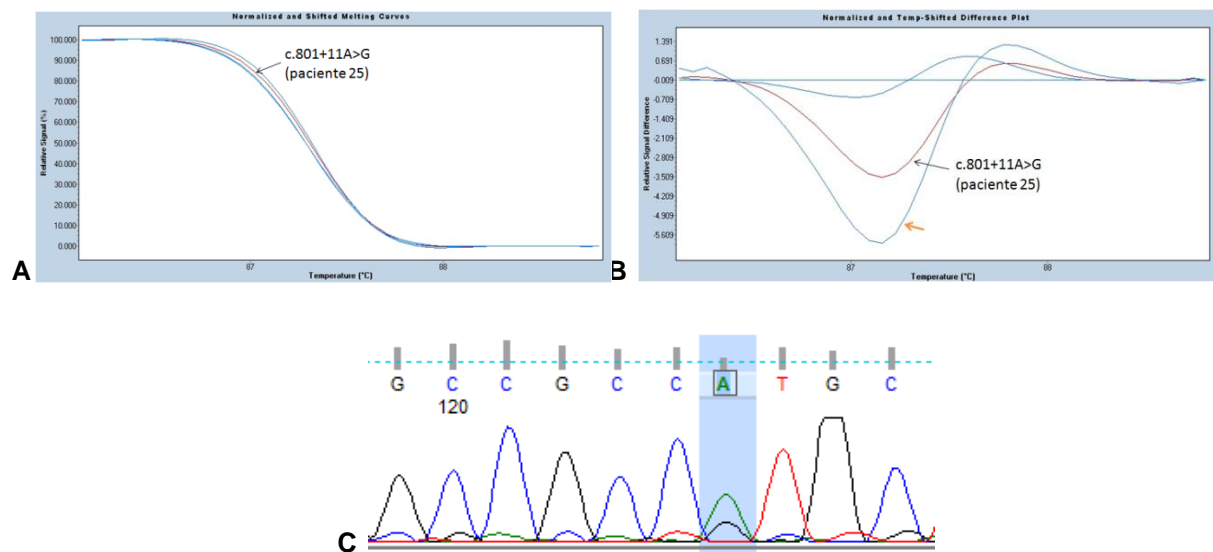
Dos 9 indivíduos em que foi detectada alteração, 4 deles (6, 11, 21 e 64) apresentaram um perfil de desnaturação semelhante entre si e um valor de diferença relativa de sinal elevado (Figura 3.14) no exão 14 do gene *TNNT2*. A sequenciação mostrou que se tratava da mesma alteração para todas as amostras referidas - c.779 A>G, p.Lys260Arg (Figura 3.2) (Tabela 3.3). Nestes indivíduos tinha já sido detectada alteração quando analisados pela técnica de iPLEX *MassArray* (Tabela 3.2).



**Figura 3.14:** Alterações detectadas no exão 14 do gene *TNNT2*. **A-** A vermelho encontram-se as curvas de desnaturação para as amostras 6, 11 e 21, que apresentam um padrão diferente das representadas a azul que correspondem às amostras controlo. **B-** *Difference plot* das amostras 6,11 e

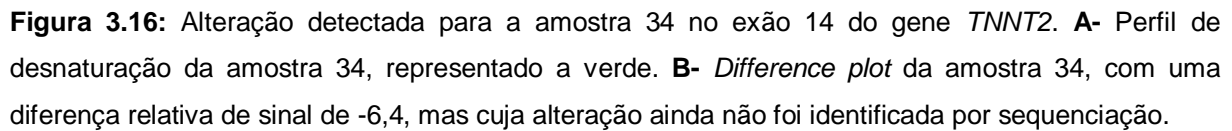
21, que apresentam diferenças relativas de sinal de +12. **C-** Curva de desnaturação para a amostra 64, representada a vermelho. A azul identificam-se os controlos. **D-** *Difference plot* da amostra 64, que apresenta uma diferença relativa de sinal de +13. Todas as amostras representadas a vermelho apresentam heterozigotia para a mutação c.779 A>G, p.Lys260Arg, a qual foi identificada por sequenciação automática como sendo a alteração já anteriormente descrita (figuras 3.1 e 3.2).

Foi também detectada uma alteração intrónica no gene *TNNT2*, para a amostra 25, alteração essa que não foi descrita até à data. Após sequenciação foi possível verificar que se tratava da alteração c.801+11 A>G, situada a 11pb após o final do exão 14 (intrão 14) (Figura 3.15). A alteração em causa pode assim ter efeitos ao nível do mecanismo de *splicing*.



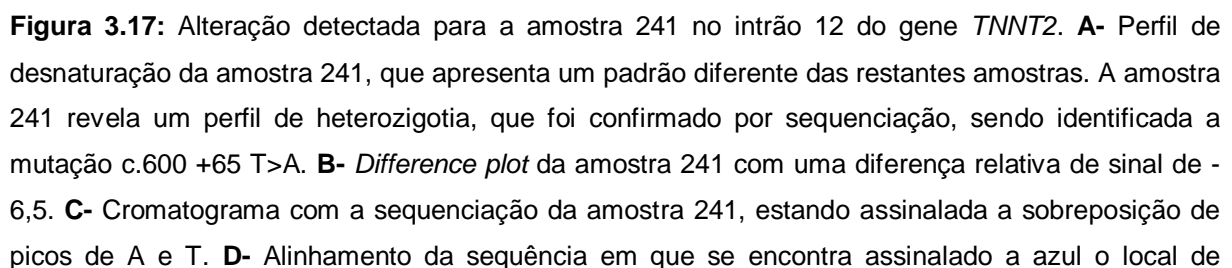
**Figura 3.15:** Alteração detectada no gene *TNNT2* para a amostra 25. **A-** Perfil de desnaturação da amostra 25, representado a vermelho. **B-** *Difference plot* da amostra 25, com uma diferença relativa de sinal de -3,5. Assinalado com a seta laranja encontra-se a amostra 129, que também apresenta diferença, mas que ainda não foi identificada por sequenciação. **C-** Cromatograma correspondente à sequenciação da amostra 25, em que a barra azul assinala a sobreposição de picos de A e G, mostrando a heterozigotia para a alteração c.801+11 A>G no intrão 14 do gene *TNNT2*.

Ainda no exão 14, foi detectada uma outra alteração para a amostra 34. No entanto, ainda não foi possível a identificação da mutação por sequenciação. No entanto, os resultados do ensaio de HRM mostram que a amostra referida apresenta um perfil de desnaturação distinto do das restantes amostras, bem como um valor de diferença de sinal de -6,4, como é possível observar na figura 3.16.



**A** Normalized and Shifted Melting Curves. The graph shows Relative Signal (%) on the y-axis (0.000 to 100.000) versus Temperature (°C) on the x-axis (85 to 86). Multiple curves are shown, with a label pointing to the c.600 +65 T>A (paciente 241) curve.

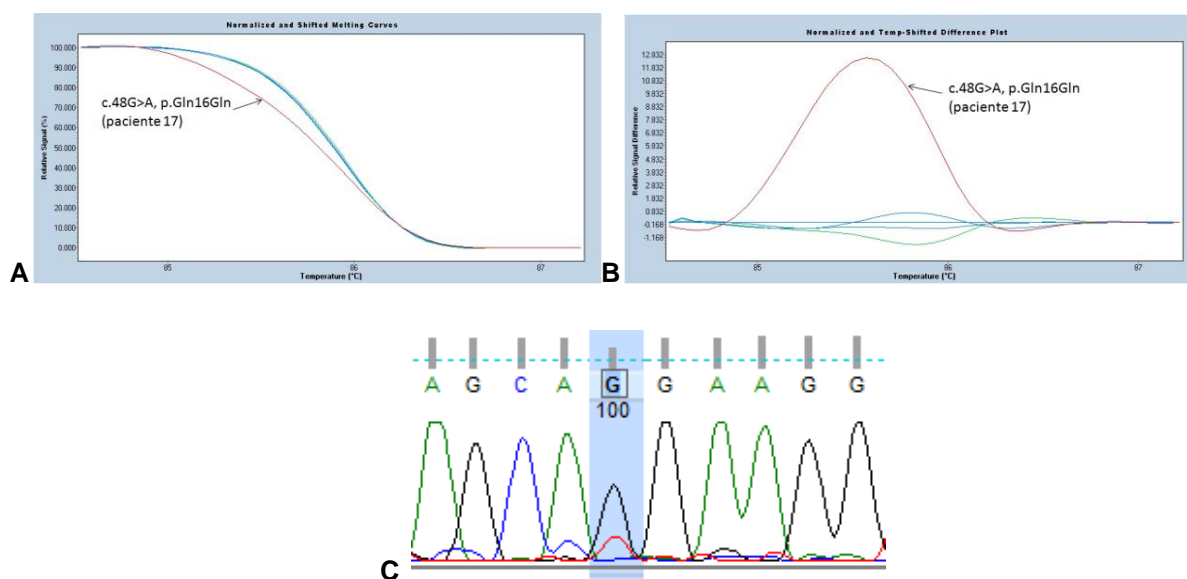
**B** Normalized and Temp-Shifted Difference Plot. The graph shows Relative Signal Difference on the y-axis (-6.952 to 1.448) versus Temperature (°C) on the x-axis (85 to 86). Multiple curves are shown, with a label pointing to the c.600 +65 T>A (paciente 241) curve.



mutação (NCBI, Blastn - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). **E-** Parte final do exão 12 e início do intrão 12 do gene *TNNT2*, com a identificação da posição da alteração detectada em HRM e confirmada por sequenciação.

Esta alteração detectada para o indivíduo 241 no intrão 12 não interfere no processo de *splicing* dado estar localizada a 65pb após o início do intrão 12, podendo ser um polimorfismo (apesar de não se encontrar descrito), situação que ocorre frequentemente em regiões intrónicas e sem patogenicidade associada.

Finalmente, no exão 3 do gene *TNNT2* foi detectada uma alteração para a amostra 17. Esta apresentou uma diferença relativa de sinal de +12,8 e um perfil de desnaturação distinto das amostras controlo, como é possível observar na figura 3.18 A e B. A sequenciação revelou a substituição de G por A na posição 48 da sequência nucleotídica (Figura 3.18C), alteração esta que não leva à mudança do a.a codificado (c.48 G>A, p.Gln16Gln). Trata-se assim de uma mutação sinónima, em que a mudança de nucleótido não altera o a.a codificado. Pode dizer-se, então, que esta alteração não produz efeitos na função nem na conformação da proteína, não justificando o fenótipo de MH do doente.

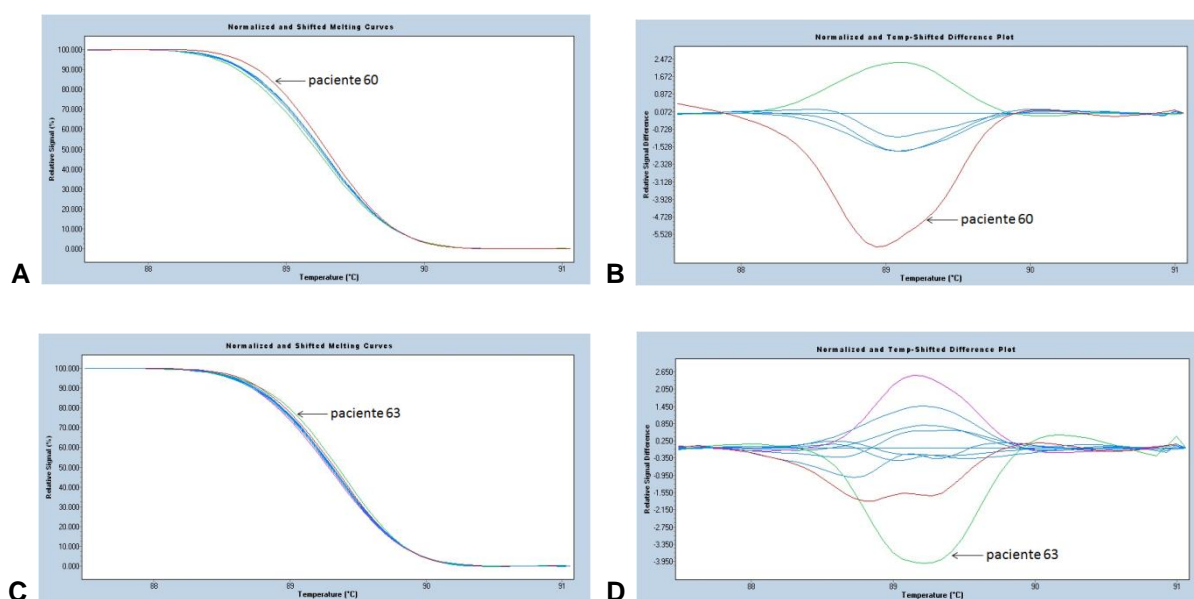


**Figura 3.18:** Alteração detectada para a amostra 17, no exão 3 do gene que codifica para a troponina T. **A-** Representado a vermelho, encontra-se o perfil de desnaturação da amostra 17, que é distinto do perfil de desnaturação das amostras controlo que estão representadas a azul. **B-** *Difference plot* da amostra 17 com uma diferença relativa de sinal de +12,8. **C-** Cromatograma com a sequenciação da amostra 17, em que a barra azul assinala a sobreposição de picos de G e A, que levam à heterozigotia para a alteração c.48 G>A, p.Gln16Gln.

### 3.3.2 Alteração detectada no gene *TNNI3*

No gene *TNNI3* foram detectadas alterações apenas no exão 7. Dos 3 indivíduos que apresentaram uma diferença significativa de sinal, até à data da escrita desta tese, apenas foi possível confirmar a alteração para uma das amostras.

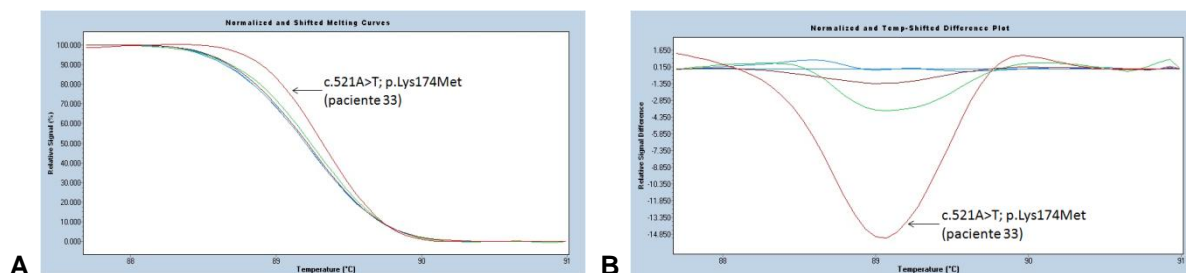
Na figura 3.19 encontram-se os resultados obtidos nos ensaios de HRM, em que as amostras 60 e 63 apresentaram uma diferença de sinal significativa quando comparadas com as amostras controlo. Apesar da alteração detectada ainda não estar identificada por sequenciação, tanto a amostra 60 como a amostra 63 apresentam um perfil de desnaturação diferente das amostras controlo.



**Figura 3.19:** Alterações detectadas para as amostras 60 e 63 no exão 7 do gene *TNNI3*. **A-** Curva de desnaturação para a amostra 60 (representada a vermelho). **B-** *Difference plot* da amostra 60, evidenciando uma diferença relativa de sinal de -5,5. **C-** Curva de desnaturação para a amostra 63. **D-** *Difference plot* da amostra 63, em que se observa uma diferença de sinal de -4.

Para o exão 7 do gene *TNNI3* tinha já sido detectada uma mutação na amostra 33, pela técnica de iPLEX *MassArray*. Essa mutação – c.521 A>T; p.Lys174Met – foi confirmada por sequenciação (Figura 3.5) (Tabela 3.2). A amostra foi também analisada pela técnica de HRM, em que se observou um perfil de desnaturação diferente do das amostras controlo e uma diferença relativa de sinal de -14,8, como é possível observar na figura 3.20. Mais uma vez, a metodologia de HRM permitiu verificar a presença de alteração numa amostra que já tinha sido identificada como mutada, corroborando a sensibilidade da técnica.





**Figura 3.20:** Alteração detectada para a amostra 33 no exão 7 do gene *TNNI3*. **A-** A vermelho está representada a curva de desnaturação da amostra 33. **B-** *Difference plot* da amostra 33, evidenciando uma diferença relativa de sinal de -14,8, sugerindo a presença de uma alteração, que foi depois identificada por sequenciação. Trata-se da mutação não sinónima c.521 A>T; p.Lys174Met já anteriormente identificada por iPLEX *MassArray* (Figura 3.5) (Tabela 3.2).

Neste exão foram já descritos 4 polimorfismos (Ensembl). Em relação a esta nova mutação seria necessário efectuar estudos populacionais para verificar se se trata, de facto, de uma mutação ou de um polimorfismo de baixa frequência na nossa população. Tal como descrito no ponto 3.2.2, uma vez que esta mutação pontual leva à alteração do a.a produzido e situa-se numa região de sensibilidade ao cálcio (Bonne *et al.*, 1998; Finn *et al.*, 2010), poderá ter efeitos na estrutura e função proteicas, o que explicaria o fenótipo de MH esporádica apresentado pelo doente. No entanto, apenas estudos funcionais poderão confirmar este facto.

### 3.3.3 Alterações detectadas no gene *MYH7*

Para o gene *MYH7* foram analisados 9 exões (23, 22, 20, 19, 14, 13, 11, 7 e 5), aos quais estão associados um maior número de alterações e que correspondem às regiões de ligação da actina bem como ao domínio motor e de ligação do ATP (Bonne, *et al.*, 1998; ENSEMBL - <http://www.ensembl.org/index.html>), dos 40 exões que compõem este gene, tendo-se detectado alterações em todos eles, com excepção do exão 20. Foram detectadas alterações em 11 indivíduos, mas até à presente data apenas existe confirmação por sequenciação para 5 deles. Os restantes aguardam os resultados de sequenciação automática. As alterações detectadas e confirmadas encontram-se dispersas pelos vários exões: uma no exão 22, uma no exão 14, uma no exão 13, uma no exão 11 e uma no exão 7 (Tabela 3.4).

Todas as alterações detectadas e confirmadas por sequenciação para o gene que codifica para a cadeia pesada  $\beta$  da miosina encontram-se sumarizadas na tabela 3.4.

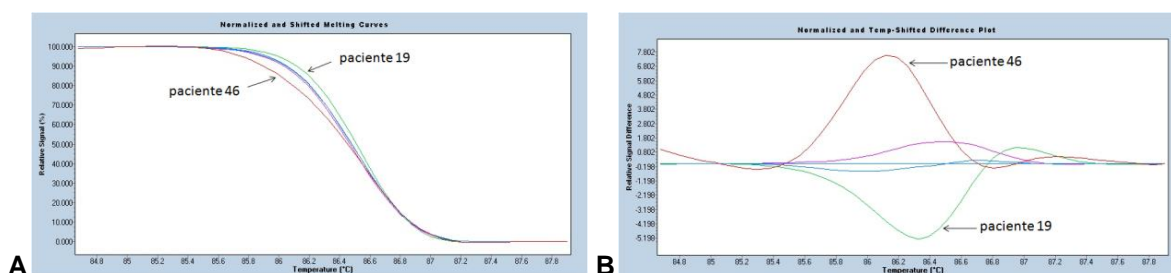
**Tabela 3.4:** Amostras com alterações detectadas no gene *MYH7* e confirmadas por sequenciação.

Amostra	Exão	Perfil de desnaturação	Resultado de Sequenciação
16	22	Diferente (+14)	c.2585 C>T, p.Ala862Val
28	14	Diferente (+12,6)	c.1358G>A; p.Arg453His
158	13	Diferente (-5)	c.1252C>A, p.Gln418Lys

19	11	Diferente (+51)	c.958G>A, p.Val320Met
14	7	Diferente (+12)	c.611 G>A, p.Arg204His

A sequência de referência usada foi NM\_000257 (Fonte: UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

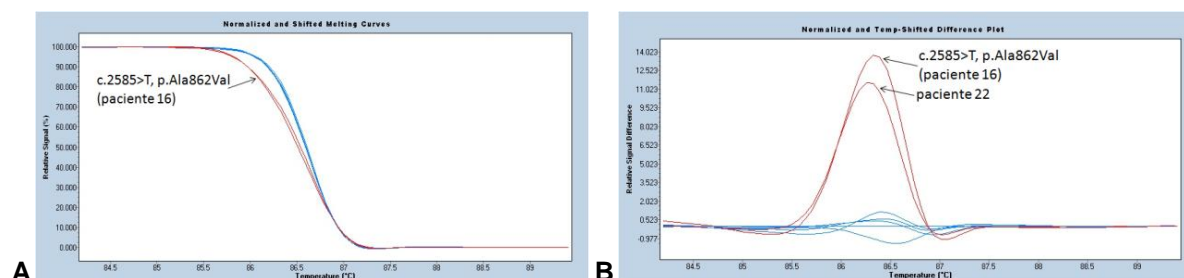
Duas amostras (19 e 46) apresentaram diferenças relativas de sinal de -5 e +8, respectivamente, para o exão 23 do gene *MYH7*, não estando, no entanto, ainda confirmada a mutação. Os gráficos resultantes do ensaio de HRM encontram-se na figura 3.21.



**Figura 3.21:** Alteração detectada nas amostras 19 e 46 para o exão 23 do gene *MYH7*. **A-** Perfil de desnaturação das amostras 19 e 46, representadas a verde e vermelho, respectivamente. **B-** *Difference plot* das amostras 19 e 46 com uma diferença relativa de sinal de -5 e +8, respectivamente.

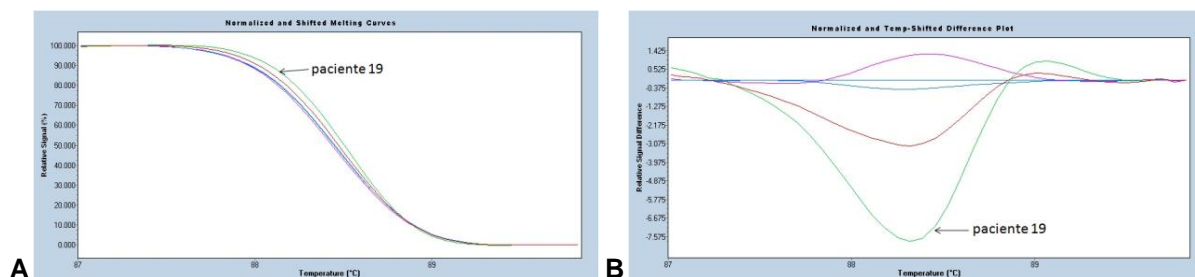
O perfil de desnaturação da amostra 19 indica que a alteração poderá ser em homozigotia para o alelo mutante. Já para a amostra 46, o perfil de desnaturação é coincidente com o expectável para uma alteração em heterozigotia (Figura 3.21A) (Taylor, 2009).

A análise de HRM efectuada para a amostra 16 revelou uma alteração no exão 22, apresentando uma diferença relativa de +14, que foi confirmada por sequenciação, tendo-se identificado a alteração c.2585 C>T, p.Ala862Val (Figura 3.22). Também a amostra 22 apresenta um perfil de desnaturação semelhante e uma diferença relativa de sinal de +11, apesar da alteração não estar ainda identificada. Em ambos os casos, o perfil observado é o esperado para amostras com alteração em heterozigotia. Visto que se trata de uma mutação nova, fez-se a sua caracterização, no sentido de perceber possíveis efeitos associados (Figura 3.22 D e E).



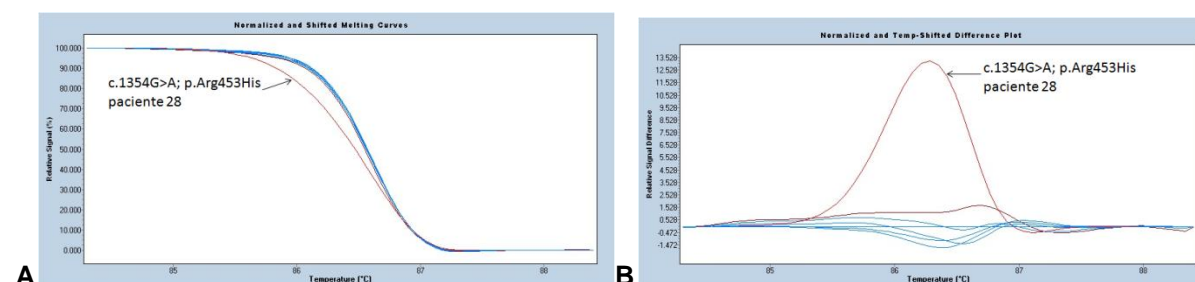






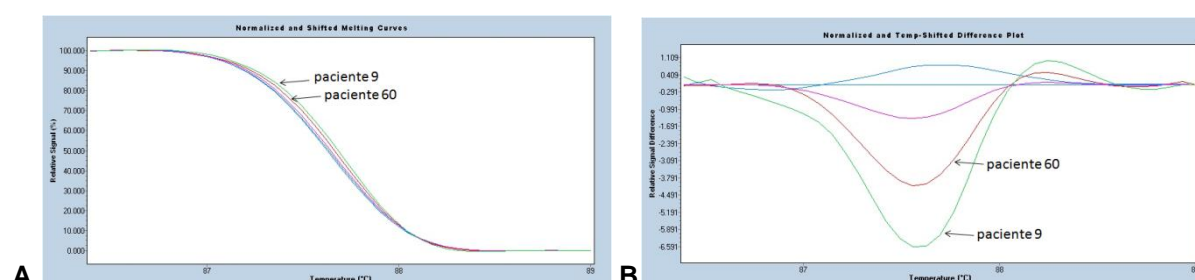
**Figura 3.23:** Alteração detectada na amostra 19, no exão 19 do gene *MYH7*. **A-** Curva de desnaturação para a amostra 19, representada a verde. **B-** *Difference plot* da amostra 19, evidenciando uma diferença relativa de sinal de -7,6.

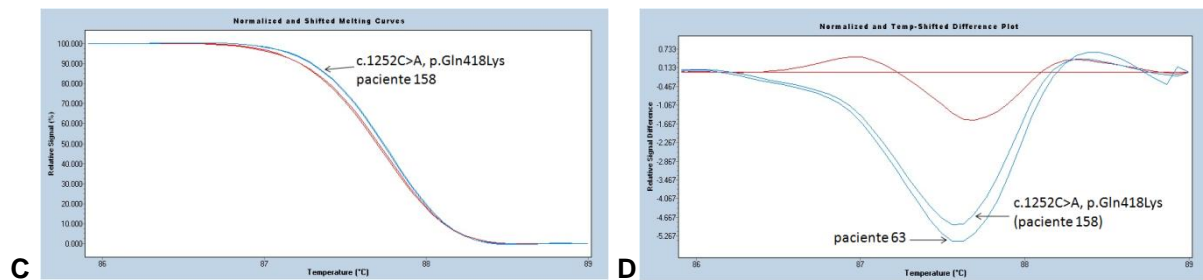
No exão 14 do gene *MYH7* foi também detectada uma alteração para a amostra 28 (Figura 3.24), alteração essa que foi identificada por sequenciação – c.1354G>A; p.Arg453His - e que já tinha sido detectada em iPLEX MassArray (Figura 3.10).



**Figura 3.24:** Alteração detectada para a amostra 28, no exão 14 do gene *MYH7*. **A-** Curva de desnaturação para a amostra 28, que está representada a vermelho. **B-** *Difference plot* da amostra 28, evidenciando uma diferença relativa de sinal de +13,5.

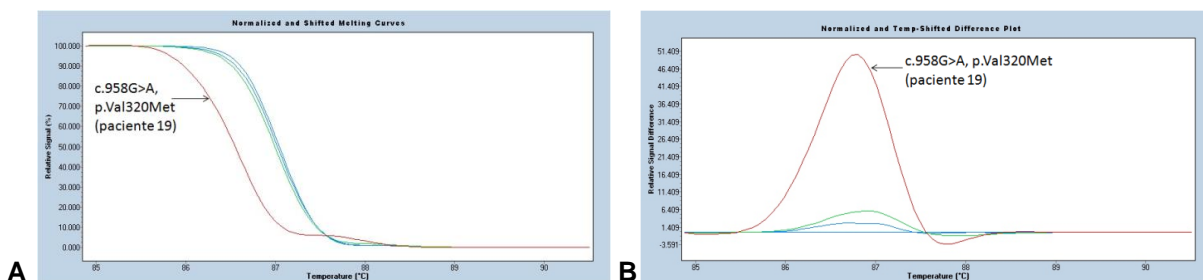
Também no exão 13 do gene *MYH7* foram detectadas alterações em 4 amostras: 9, 60, 63 e 158. No entanto, até à data apenas se conseguiu ainda confirmar, por sequenciação, a mutação para a amostra 158 - c.1252 C>A, p.Gln418Lys. Esta alteração tinha já sido detectada por iPLEX MassArray (Figura 3.25 e 3.7), confirmando uma vez mais a potencialidade e sensibilidade da tecnologia de HRM na detecção de alterações.





**Figura 3.25:** Alterações detectadas no exão 13 do gene *MYH7*. **A-** Curvas de desnaturação para as amostras 9 e 60. **B -** *Difference plot* das amostras 9 e 60, evidenciando uma diferença relativa de sinal de -6,6 e -4, respectivamente. **C-** Curva de desnaturação para a amostra 158, representada a azul. **D-** *Difference plot* da amostra 158, evidenciando uma diferença relativa de sinal de -4,6. Também se encontra assinalada a amostra 63, com uma diferença relativa de -5,2.

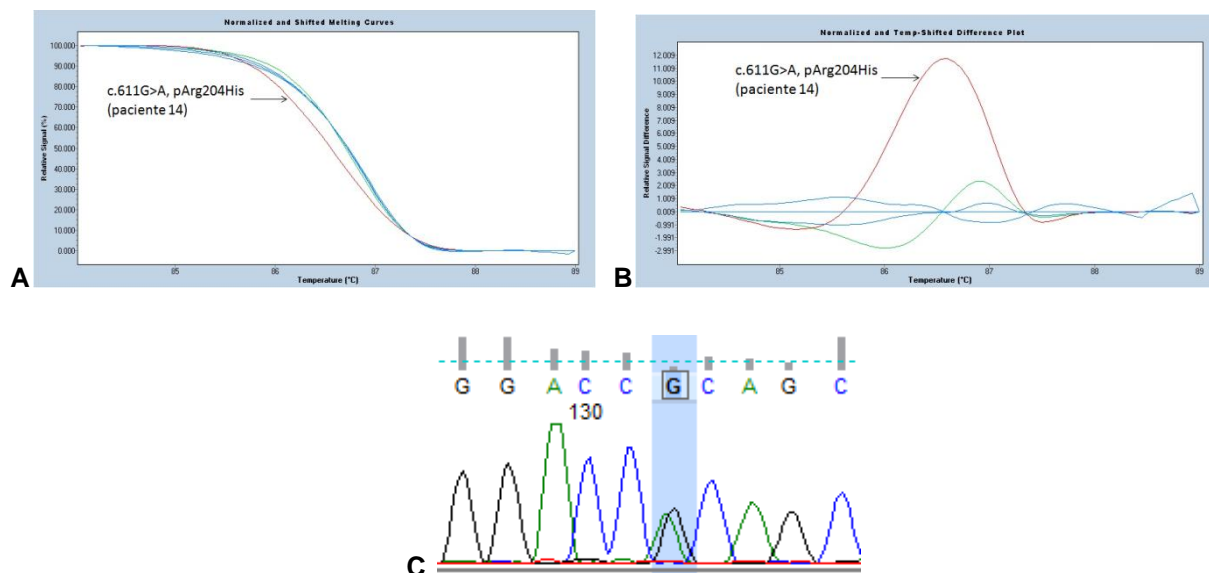
Para o exão 11 de *MYH7* tinha já sido detectada uma mutação na amostra 19, pela técnica de iPLEX *MassArray*. Essa mutação, c.958 G>A; p.Val320Met, confirmada por sequenciação (Figura 3.6), foi também identificada pela técnica de HRM, observando-se um perfil de desnaturação com uma diferença de sinal elevada relativamente às amostras controlo, como é possível verificar na figura 3.26.



**Figura 3.26:** Alteração detectada para a amostra 19 no exão 11 do gene *MYH7*. **A-** Curva de desnaturação da amostra 19, representada a vermelho. **B -** *Difference plot* da amostra 19, evidenciando uma diferença relativa de sinal de +51.

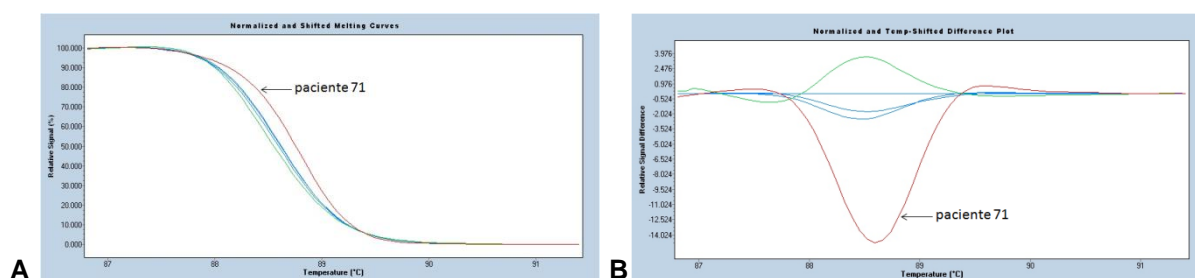
É de salientar que na amostra 19 além desta alteração no exão 11 do gene *MYH7*, que se encontra confirmada por sequenciação, foram também detectadas duas outras alterações nos exões 19 e 23 do mesmo gene. Apesar dessas alterações ainda não estarem identificadas, se se confirmarem, estaremos perante um caso de tripla mutação num gene que codifica para uma proteína com um papel fundamental para o bom funcionamento do sarcómero. Além disso, a amostra 19 é homozigótica para a deleção (DD) no intrão 16 do gene *ACE1*, o que deverá ser um factor agravante para um maior risco de morte súbita. Para além do mais, este doente foi já sujeito à implantação de um desfibrilhador-cardioversor, pelo que é um caso grave de MH. Tal como referido no ponto 3.2.3, a gravidade da doença estará muito provavelmente associada à alteração que se encontra confirmada.

Relativamente à amostra 14, foi detectada uma alteração no exão 7 do gene *MYH7* (Figura 3.27) que foi confirmada por sequenciação, revelando que se tratava da mutação c.611 G>A, pArg204His. O perfil de desnaturação da amostra era indicativo da presença de uma alteração em heterozigotia, tal como se veio a verificar após a sequenciação.



**Figura 3.27:** Alteração detectada para a amostra 14 no exão 7 do gene *MYH7*. **A-** Curva de desnaturação para a amostra 14 (representada a vermelho). **B -** *Difference plot* da amostra 14, evidenciando uma diferença relativa de sinal de +12. **C-** Cromatograma com a sequenciação da amostra 14 em que se observa a sobreposição de picos de G e A, mostrando a heterozigotia para a mutação c.611 G>A, pArg204His.

A amostra 71 apresentou uma alteração por HRM, no exão 5 do gene *MYH7* (Figura 3.28). No entanto, esta alteração ainda não se encontra confirmada por sequenciação.



**Figura 3.28:** Alteração detectada para a amostra 71 no exão 5 do gene *MYH7*. **A-** Curva de desnaturação para a amostra 71 que está representada a vermelho. **B -** *Difference plot* da amostra 71, evidenciando uma diferença relativa de sinal de -14.

### 3.3.4 Alterações detectadas no gene *MYBPC3*

Para o gene *MYBPC3* foram detectadas alterações para quatro (25, 23, 17 e 16) dos exões analisados (tabela 2.5). Dos 9 indivíduos em que foi detectada alteração, até à data só estão confirmados 2 indivíduos por sequenciação (tabela 3.5). Os restantes aguardam os resultados de sequenciação automática.

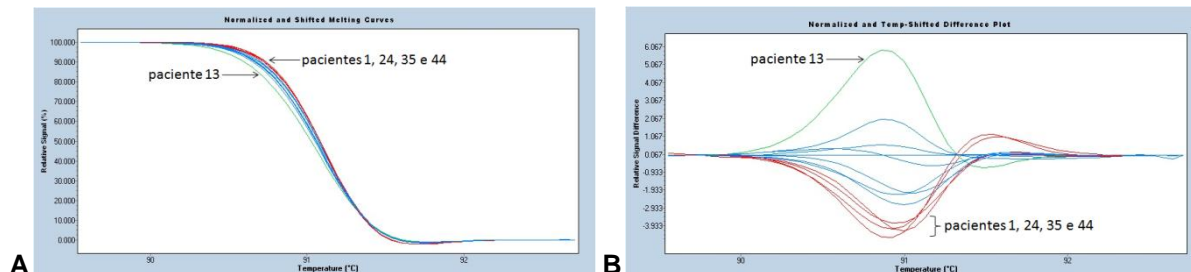
Todas as alterações detectadas e confirmadas por sequenciação para o gene que codifica para a proteína C de ligação à miosina cardíaca encontram-se sumarizadas na tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Amostras com alterações detectadas no gene *MYBPC3* e confirmadas por sequenciação.

Amostra	Exão	Perfil de Desnaturação	Resultado de Sequenciação
168	23	Diferente (-7,5)	c.2470 C>A; p.Leu824Met
15	16	Diferente (+13)	c.1727G>A; p.Trp576X – Santos <i>et al</i> , 2011

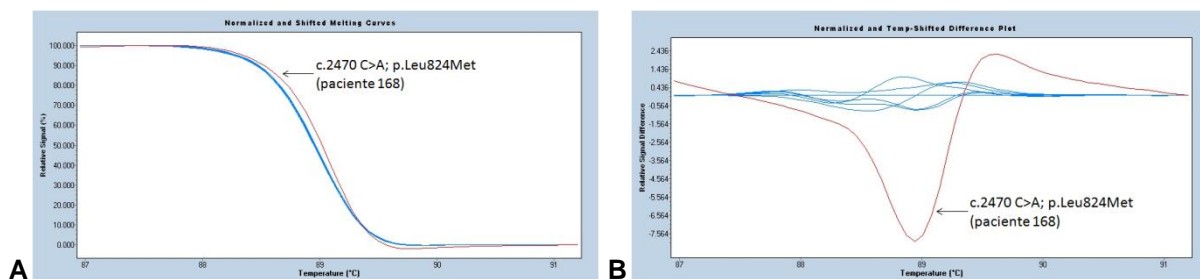
A sequência de referência usada foi: NM\_000256 (Fonte: UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

As amostras 1, 13, 24, 35 e 44 apresentaram alterações, quando analisadas por HRM no exão 25 do gene *MYBPC3*. Os resultados, apesar de ainda aguardarem confirmação por sequenciação, encontram-se na figura 3.29.



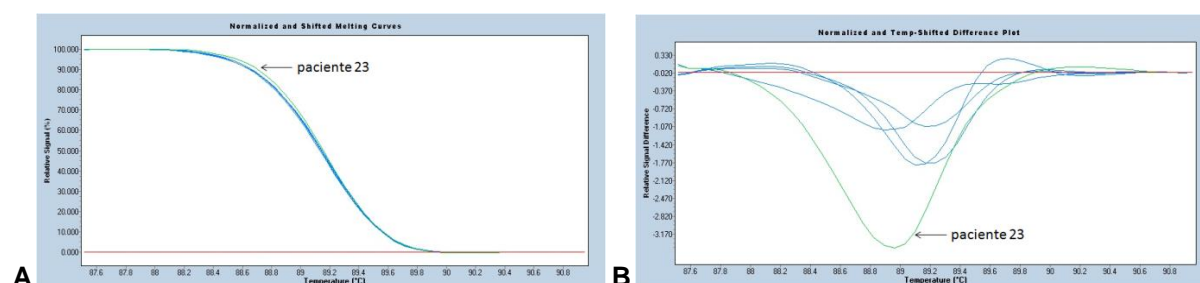
**Figura 3.29:** Alterações detectadas no exão 25 do gene *MYBPC3*. **A-** Perfil de desnaturação para as amostras identificadas em cada imagem, para o exão 25 do gene *MYBPC3*. **B-** *Difference plot* do exão 25 do gene *MYBPC3* para as amostras 1, 13, 24, 35 e 44, mostrando valores de diferença relativa de sinal de -4, +6, -4,2, -4 e -3,8, respectivamente.

Para o exão 23 do gene *MYBPC3* tinha já sido detectada uma alteração na amostra 168, pela técnica de iPLEX *MassArray*. Essa mutação - c.2470 C>A; p.Leu824Met – que foi confirmada por sequenciação (Figura 3.12), foi também detectada pela técnica de HRM, observando-se um perfil de desnaturação com uma diferença de sinal elevada (-7,5) relativamente às amostras controlo, como é possível verificar na figura 3.30. Mais uma vez, a metodologia de HRM permitiu verificar a presença de alteração numa amostra que já tinha sido identificada como mutada, corroborando a sensibilidade da técnica.



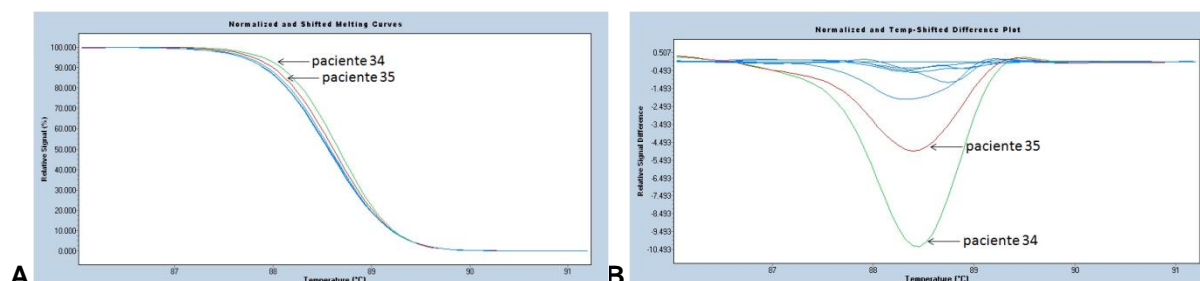
**Figura 3.30:** Alteração detectada para a amostra 168 no exão 23 do gene *MYBPC3*. **A-** Perfil de desnaturação para a amostra 168 que está representada a vermelho. **B-** *Difference plot* da amostra 168, em que se observa uma diferença relativa de sinal de -7,5.

Ainda no exão 23 do gene *MYBPC3* foi detectada alteração na amostra 23 (Figura 3.31), que aguarda a confirmação por sequenciação.



**Figura 3.31:** Alteração detectada para a amostra 23 no exão 23 do gene *MYBPC3*. **A-** Perfil de desnaturação para a amostra 23 que está representada a verde. **B-** *Difference plot* da amostra 23 para o exão 23 do gene *MYBPC3*, em que se observa um valor de diferença de sinal de -3,1.

Para o exão 17 do gene *MYBPC3* foram detectadas, por HRM, alterações nas amostras 34 e 35, aguardando ambas a confirmação por sequenciação. Como é possível observar na figura 3.32, as amostras referidas apresentam um perfil de desnaturação distinto do das amostras controlo.

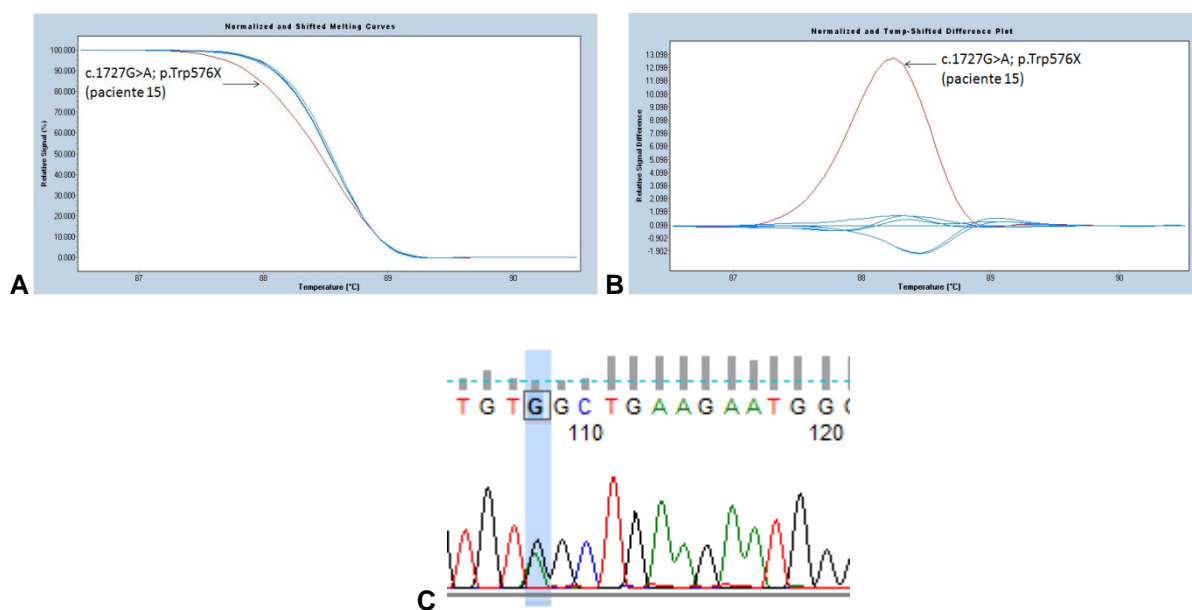


**Figura 3.32:** Alterações detectadas nas amostras 34 e 35 para o exão 17 do gene *MYBPC3*. **A –** Perfil de desnaturação para as amostras 34 e 35, para o exão 17 do gene *MYBPC3*, representadas a verde e vermelho, respectivamente. **B -** *Difference plot* do exão 17 do gene *MYBPC3* para as amostras 34 e 35, que apresentam uma diferença de sinal de -10,5 e -4,5, respectivamente.



A amostra 34 além de apresentar uma diferença em relação às amostras controlo para o exão 17 do gene *MYBPC3*, tinha também já apresentado uma alteração no exão 14 do gene *TNNT2* (Figura 3.16). Apesar de alterações no gene *MYBPC3* estarem geralmente associadas a um aparecimento tardio da doença (Cardim *et al.*, 2005), as alterações em *TNNT2* estão geralmente associadas a um prognóstico maligno e a uma elevada incidência de morte súbita (Michels *et al.*, 2009; Morimoto, 2008; Brito e Madeira, 2005). Este paciente é heterozigótico para a inserção/delecção (ID) no intrão 16 do gene *ACE1*, não tendo portanto, um risco acrescido de morte súbita. No entanto, se as duas alterações detectadas se confirmarem, e portanto, se se tratar de um indivíduo heterozigota composto, poderá ter manifestações mais severas da doença (Christiaans *et al.*, 2010; Girolami, 2010; Ingles *et al.*, 2005; Arad, *et al.*, 2002). Também a amostra 35 apresenta alterações nos mesmos exões e genes da amostra 34, no entanto, este indivíduo é homozigótico para a delecção (DD) no intrão 16 do gene *ACE1*, o que faz com que tenha um maior risco de morte súbita associado.

Para o exão 16 do gene *MYBPC3* detectou-se por HRM, na amostra 15, uma alteração identificada por sequenciação como c.1727 G>A; p.Trp576X, já descrita anteriormente por Santos e colaboradores em 2011, através da utilização da técnica de iPLEX MassArray (Figura 3.33). Como é possível observar na figura 3.33A, a amostra 15 apresenta um perfil de desnaturação característico de uma amostra com alteração em heterozigotia.



**Figura 3.33:** Alteração detectada para a amostra 15 no exão 16 do gene *MYBPC3*. **A** – Curva de desnaturação da amostra 15, que está representada a vermelho. **B**- *Difference plot* do exão 16 do gene *MYBPC3* para a amostra 15, que apresentou uma diferença relativa de +13. **C**- Cromatograma com a sequenciação da amostra 15, em que a barra azul assinala a sobreposição de picos de G e A, mostrando a heterozigotia para a mutação c.1727 G>A; p.Trp576X.

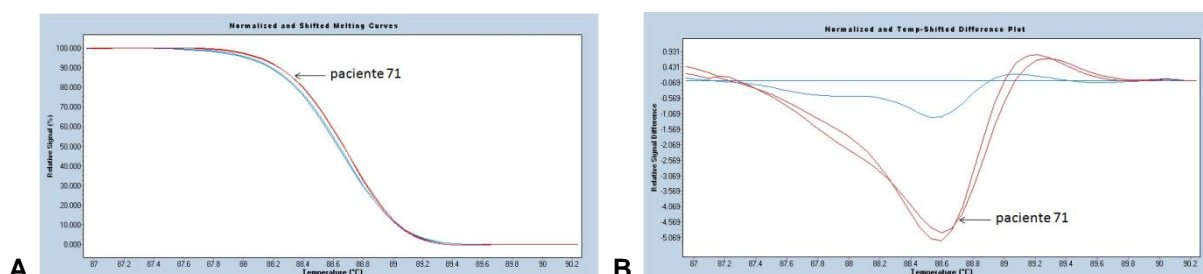
A substituição de G por A no nucleótido 1727 leva à formação de um codão stop prematuro, originando uma proteína truncada (a proteína *wild type* é constituída por 1274 a.a, enquanto a

proteína mutada vai ter apenas 576 a.a) (NCBI - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Apesar do indivíduo 15 ser heterozigótico para a inserção/delecção (ID) do intrão 16 do gene *ACE1*, não apresentando por este facto um risco acrescido de morte súbita associado a este polimorfismo, esta mutação origina a produção de uma proteína truncada, que deverá ter efeitos muito graves na estrutura final da proteína, uma vez que se perde o domínio de ligação à titina e o principal domínio de ligação à miosina (Bonne *et al.*, 1998; Finn *et al.*, 2010), sendo muito provavelmente a causa da MH deste doente.

### **3.3.5 Alterações detectadas no gene *MYL2***

Sendo uma proteína que se liga ao cálcio, mutações no gene *MYL2* levam à alteração do local de fosforilação e/ou de ligação ao cálcio (Richard *et al.*, 2003; Fatkin e Graham, 2002).

Assim, analisou-se por HRM, o exão 7 do gene que codifica para a cadeia leve regulatória da miosina – *MYL2* - uma vez que é um dos exões com maior número de alterações associadas (NCBI, Ensembl). Foi detectada uma alteração num dos indivíduos, sendo que um dos controlos utilizados no ensaio parece também apresentar a mesma alteração, uma vez que têm o mesmo perfil de desnaturação e um valor de diferença relativa semelhante (Figura 3.34). Em ambos os casos, aguarda-se o resultado da sequenciação. A confirmar-se estarmos perante a mesma alteração genética, teremos de realizar estudos populacionais pois poderemos estar na presença de um polimorfismo geral da população portuguesa e que não estará na etiologia da MH apresentada pelo indivíduo 71.

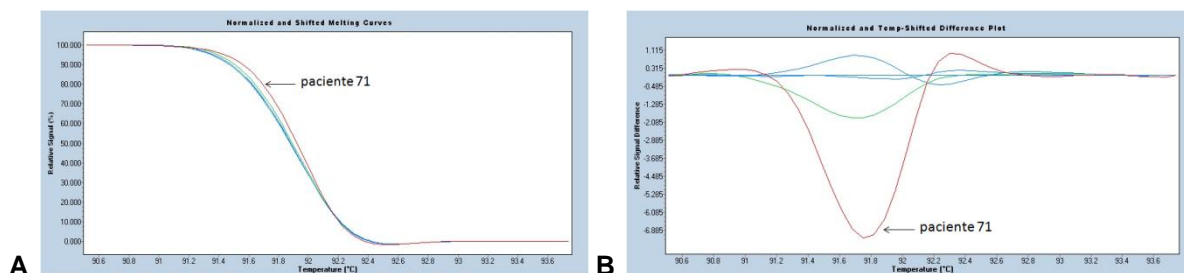


**Figura 3.34:** Alteração detectada na amostra 71 para o exão 7 do gene *MYL2*. **A-** Curva de desnaturação da amostra 71 e de um dos controlos. **B-** *Difference plot* da amostra 71 e de um controlo, que apresentou uma diferença relativa de sinal de -5.

### **3.3.6 Alterações detectadas no gene *TCAP***

Para o gene que codifica a proteína teletonina – *TCAP* – foi detectada uma alteração apenas para o indivíduo 71. A alteração ainda aguarda o resultado da sequenciação, mas como é possível observar pela análise da figura 3.35, o indivíduo 71 apresenta um perfil de desnaturação distinto das amostras controlo e um *difference plot* com uma diferença relativa de sinal de +6,9.





**Figura 3.35:** Alteração detectada para a amostra 71 no exão 1 do gene *TCAP*. **A-** Curva de desnaturação da amostra 71. **B-** *Difference plot* da amostra 71, que apresentou uma diferença relativa de sinal de +6,9.

Este não é um gene muito estudado, sendo que, no exão 1 apenas se encontram descritas 2 mutações: c.32 C>T; p.Ser11Leu e c.53 G>A; p.Arg18Gln (Ensembl).

O paciente 71 apresenta alterações em vários genes diferentes (*MYH7*, *MYL2* e *TCAP*) (Figuras 3.28, 3.34, 3.35), além de apresentar homozigotia para a deleção (DD) no intrão 16 do gene *ACE1*. Se todas estas alterações se confirmarem por sequenciação, estaremos perante um caso de mutação composta agravada com um risco de morte súbita bastante elevado.

### **3.3.7 Alterações detectadas no gene *ACTC1***

Para o gene *ACTC1*, apenas se fez análise do exão 6, porque é o exão que apresenta mais polimorfismos descritos (quatro) (Ensembl). No entanto, não foi detectada alteração em nenhuma amostra (resultados não apresentados).

De acordo com os resultados obtidos, a distribuição das mutações na população portuguesa assemelha-se mais à situação dos EUA, em que são mais frequentes as mutações “privadas”, ou seja, cada família apresenta uma mutação diferente, apesar de, por exemplo no gene *TNNT2*, indivíduos não relacionados apresentarem a mesma alteração (c.779 A>G, p.Lys260Arg), que através da realização do estudo populacional se percebeu tratar-se de um polimorfismo de baixa frequência.

Em suma, neste trabalho foram identificadas 34 alterações em 29 indivíduos, das quais 15 já se encontram confirmadas por sequenciação automática. Dessas, 6 são alterações nunca antes descritas: duas no gene *MYH7* (c.2585 C>T; p.Ala862Val e c.1252 C>A; p.Gln418Lys), uma no gene *MYBPC3* (c.2470 C>A; p.Leu824Met), duas novas alterações intrónicas no gene *TNNT2* (c.801+11A>G e c.600+65T>A) e uma nova alteração no gene *TNNI3* (c.521 A>T; p.Lys174Met).

É necessária a realização de estudos populacionais, através da análise de controlos saudáveis (indivíduos sem fenótipo de MH nem história familiar da doença), bem como a realização de estudos funcionais para todas as novas alterações detectadas, no sentido de compreender se estas

alterações se tratam de mutações ou de polimorfismos da nossa população e se estão, de facto, associadas a MH, podendo assim justificar o fenótipo apresentado pelos doentes.

Assim, e apesar da metodologia de *iPLEX MassArray* ainda necessitar de continuar a ser optimizada, uma vez que apresenta alguns resultados falsos positivos, a sua conjugação com a metodologia de HRM apresenta-se como uma boa estratégia na detecção mais rápida de alterações conhecidas e desconhecidas, respectivamente, tal como já foi apresentado nos estudos realizados por Santos e colaboradores em 2010 e 2011. Ambas as técnicas possibilitam a análise de um maior número de doentes num reduzido espaço de tempo e com menores custos, relativamente à metodologia actualmente utilizada no diagnóstico de MH (sequenciação automática).

#### 4- CONCLUSÃO

Este trabalho teve como principais objectivos a optimização dos testes genéticos utilizados no diagnóstico de MH, recorrendo para isso a duas metodologias: a Genotipagem por Espectrometria de Massa (iPLEX *MassArray*) para detecção de mutações conhecidas e a Desnaturação de Alta Resolução (HRM) para pesquisa de novas mutações. Ambas as técnicas foram utilizadas na caracterização das alterações associadas a MH, para um conjunto de 37 indivíduos da população portuguesa, com diagnóstico clínico da doença. Além disso, pretendeu-se, sempre que possível, integrar a informação clínica de cada indivíduo com os dados de genotipagem, no sentido de tentar estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo. Assim, na amostra populacional analisada, foram detectadas alterações em 29 indivíduos, tendo já sido confirmadas por sequenciação 5 alterações em *MYH7*, das quais 2 novas (c.2585 C>T; p.Ala862Val e c.1252 C>A; p.Gln418Lys), 2 alterações em *MYBPC3*, uma delas nunca descrita (c.2470 C>A; p.Leu824Met), 7 alterações em *TNNT2*, das quais 2 novas e ambas intrónicas (c.801+11A>G e c.600+65T>A) e uma nova alteração em *TNNI3* (c.521 A>T; p.Lys174Met). Estes resultados são concordantes com os obtidos noutros estudos, em que as principais alterações detectadas se encontram nos genes referidos.

Seria importante realizar estudos populacionais com o intuito de perceber se as novas alterações identificadas são polimorfismos da população portuguesa ou se são mutações características dos doentes, podendo assim justificar o fenótipo apresentado.

Para compreender o significado biológico e as implicações fenotípicas associadas a cada nova alteração seria necessário realizar estudos que permitissem verificar as modificações conformacionais provocadas na proteína afectada, devido à mudança de a.a, utilizando para isso ferramentas bioinformáticas. Seria também necessário efectuar estudos funcionais utilizando modelos animais (por ex. murganho) e/ou linhas celulares de cardiomiócitos. Nas linhas celulares seria possível avaliar as alterações ao nível da estrutura do sarcómero, bem como as variações energéticas e dos níveis de cálcio, que ocorreriam aquando da mutação de uma determinada proteína. Recorrendo à técnica de *yeast two hybrid*, seria possível analisar a interacção entre proteínas, a influência das alterações genéticas ao nível da função proteica e as consequências fenotípicas associadas.

Pretende-se continuar o processo de optimização do diagnóstico de MH, nomeadamente da técnica de iPLEX *MassArray*, uma vez que permite a genotipagem de vários doentes para centenas de mutações em muitos genes que se sabe que estão associados a MH, mas que, devido ao elevado custo da sequenciação, não são geralmente analisados. Também a técnica de HRM se verificou ser altamente sensível na detecção de alterações no DNA, sendo uma metodologia com grande potencialidade e que, portanto, deve continuar a ser aperfeiçoada no sentido de abranger um maior número de genes. Assim, a aplicação destas duas metodologias ao diagnóstico genético de MH, permitirá a caracterização dos doentes de uma forma mais rápida, eficiente, completa e a custos mais reduzidos, contribuindo para uma melhoria significativa da prática clínica ao nível do prognóstico e da detecção precoce de casos de morte súbita.



## 5- BIBLIOGRAFIA

- Alders, M., Jongbloed, R., Deelen, W., van den Wijngaard, A., Doevendans, P., Ten, C. F., Regitz-Zagrosek, V., Vosberg, H.P., van Langen, I., Wilde, A., Dooijes, D., Mannens, M. 2003. The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J.* 24(20):1848-53.
- Andersen, P. S., Havndrup, O., Hougs, L., Sørensen, K. M., Jensen, M., Larsen, L.A., Hedley, P., Thomsen, A.R.B., Moolman-Smook, J., Christiansen, M., Bundgaard, H. 2009. Diagnostic Yield, Interpretation, and Clinical Utility of Mutation Screening of Sarcomere Encoding Genes in Danish Hypertrophic Cardiomyopathy Patients and Relatives. *Human Mutation* 30(3): 363–370.
- Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C.G., Glerum, D.M., Hoffbuhr, K.C., Leary, S.C., Kennaway, N.G., Shoubbridge, E.A. 2003. Mutations in *COX15* produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics* 72: 101-114.
- Arad, M., Seidman, J.G., Seidman, C. E. 2002. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 11(20): 2499-2506.
- Ashrafian, H., Redwood, C., Blair, E., Watkins, H. 2003. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet* 19:263–268.
- Audrezet, M.P., Dabricot, A., Le Marechal, C., Ferec, C., 2008. Technical advance validation of high resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. *Journal of Molecular Diagnostics* 10(5): 424-434.
- Bashyam, M.D., Savithri, G.R., Kumar, M.S., Narasimham, C., Nallari, P. 2003. Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC). *Journal of Human Genetics* 48: 55-64.
- Blondal, T., Waage, B.G., Smarason, S.V., Jonsson, F., Fjalldal, S.B., Stefansson, K., Gulcher, J., Smith, A.V. 2003. A novel MALDI-TOF based methodology for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research* 31 (24):e155.
- Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., Schwartz, K. 1998. Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: From Mutations to Functional Defects. *Circ. Res.* 83: 580-593.
- Bos, J.M., Poley, R.N., Ny, M., Tester, D.J., Xu, X., Vatta, M., Towbin, J.A., Gersh, B.J., Ommen, S.R., Ackerman, M.J. 2006. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Molecular Genetics and Metabolism* 88: 78-85.
- Bos, J.M., Towbin, J. A., Ackerman, M. J. 2009. Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Implications of Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 54:201–11.
- Bos, J.M., Ackerman, M.J. 2010. Z-Disc genes in hypertrophic cardiomyopathy - Stretching the cardiomyopathies? *Journal of the American College of Cardiology* 55(11): 1136-1138.
- Briona, M., Allegue, C., Gil, R., Blanco-Verea, A., Carracedo, A., Pagannone, E., Evangelista, A., Di Castro, S., Marchitti, S., Stanzione, R., Volpec, M., Rubattu, S. 2010. Identification of a Novel MYBPC3 Gene Variant in a Patient With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 40(3):285-289.

- Brito, D., Richard, P., Isnard, R., Pipa, J., Komajda, M., Madeira, H. 2003. Miocardiopatia Hipertrófica Familiar: a mesma mutação, diferente expressão fenotípica. Estudo comparativo de duas famílias. *Rev Port Cardiol* 22 (12): 1445-1461.
- Brito, D., Madeira, H. 2005. Mutações Malignas na Miocardiopatia Hipertrófica: Realidade ou Ficção? *Rev Port Cardiol* 24 (9): 1137-1146.
- Cardim, N., Perrot, A., Santos, S., Morgado, P., Padua, M., Ferreira, S., Reis, R.P., Monteiro, C., Ferreira, T., Correia, J.M., Osterziel, K. J. 2005. Miocardiopatia Hipertrófica em População Portuguesa: mutações da proteína C que liga a miosina. *Rev Port Cardiol* 21(12):1463-1476.
- Christiaans, I., Nannenberg, E. A., Dooijes, D., Jongbloed, R. J. E., Michels, M., Postema, P. G., Majoor-Krakauer, D., van den Wijngaard, A., Mannens, M. M. A. M., van Tintelen, J. P., van Langen, I. M., Wilde, A. A. M. 2010a. Founder mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients in the Netherlands. *Neth Heart J* 18:248-54.
- Christiaans, I., van Engelen, K., van Langen, I.M., Birnie, E., Bonzel, G. J., Elliott, P. M., Wilde, A. A. M. 2010. Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace* 12:313-21.
- Deprez, R.H.L., Muurling-Vlietman, J.J., Hruda, J., Baars, M.J.H., Wijnaendts, L.C.D., Stolte-Dijkstra, I., Alders, M., van Hagen, J.M. 2006. Two cases of severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy caused by compound heterozygous mutations in the *MYBPC3* gene. *J Med Genet* 43:829–832.
- Dhandapany, P.S., Sadayappan, S., Xue, Y., Powell, G.T., Rani, D.S., Nallari, P., Rai, T.S., Khullar, M., Soares, P., Bahl, A., Tharkan, J.M., Vaideeswar, P., Rathinavel, A., Narasimhan, C., Ayapati, D.R., Ayub, Q., Mehdi, S.Q., Oppenheimer, S., Richards, M. B., Price, A. L., Patterson, N., Reich, D., Singh, L., Tyler-Smith, C., Thangaraj, K. 2009. A common MYBPC3 (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. *Nat Genet.* 41(2):187-91.
- Doolan, G., Nguyen, L., Chung, J., Ingles, J., Semsarian, C. 2004. Progression of left ventricular hypertrophy and the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 96(2):157-63.
- Ehlermann, P., Weichenhan, D., Zehelein, J., Steen, H., Pribe, R., Zeller, R., Lehrke, S., Zugck, C., Ivandic, B. T., Katus, H. A. 2008. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the *MYBPC3* gene. *BMC Medical Genetics* 9:95.
- Ensembl - <http://www.ensembl.org/index.html> (acedido em Julho e Agosto de 2011)
- Erali, M., Voelkerding, K.V., Wittwer, C.T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* 85(1):50-8.
- Fatkin, D., Graham, R.M. 2002. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiological Reviews* 82: 945-980.
- Fifer, M.A., Vlahakes, G.J. 2008. Management of Symptoms in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*.117:429-439.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A. 2010. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research Database Issue* 38: D211-222 - <http://pfam.sanger.ac.uk/>.

- Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J., Watkins, H. 2004. Cardiac Myosin Binding Protein C: Its Role in Physiology and Disease. *Circ. Res.* 94:1279-1289.
- Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J.M., Frank, D., Rutten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Katus, H.A., Hill, J.A., Olson, E.N. 2004. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med.* 10:1336–1343.
- Friedrich, F.W., Bausero, P., Sun, Y., Treszl, A., Krämer, E., Juhr, D., Richard, P., Wegscheider, K., Schwartz, K., Brito, D., Arbustini, E., Waldenström, A., Isnard, R., Komajda, M., Eschenhagen, T., Carrier, L. 2009. A new polymorphism in human calmodulin III gene promoter is a potential modifier gene for familial hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal* 30: 1648–1655.
- Gabriel, S., Ziaugra, L., Tabbaa, D. 2009. SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 60:2.12.1-2.12.18.
- Geier, C., Perrot, A., Özcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pilz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., van der Ven, P., Fürst, D. O., Vornwald, A., von Hodenberg, E., Nürnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R., Osterziel, K. J. 2003. Mutations in the Human Muscle LIM Protein Gene in Families With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 107: 1390-1395.
- Geier, C., Gehmlich, K., Ehler, E., Hassfeld, S., Perrot, A., Hayess, K., Cardim, N., Wenzel, K., Erdmann, B., Krackhardt, F., Posch, M.G., Bublak, A., Nägele, H., Scheffold, T., Dietz, R., Chien, K.R., Spuler, S., Fürst, D.O., Nürnberg, P., Özcelik, C. 2008. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 17(18): 2753–2765.
- Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School. <http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home> (acedido em Junho de 2011).
- Gimeno, J. R., Monserrat, L., Pérez-Sánchez, I., Marín, F., Caballero, L., Hermida-Prieto, M., Castro, A., Valdés, M. 2009. Hypertrophic Cardiomyopathy. A Study of the Troponin-T Gene in 127 Spanish Families. *Rev Esp Cardiol.* 62(12):1473-7.
- Girolami, F., Ho, C. Y., Semsarian, C., Baldi, M., Will, M. L., Baldini, K., Torricelli, F., Yeates, L., Cecchi, F., Ackerman, M. J., Olivetto, I. 2010. Clinical Features and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated With Triple Sarcomere Protein Gene Mutations. *J Am Coll Cardiol* 55:1444–53.
- Girolami, F., Olivetto, I., Passerini, I., Zachara, E., Nistri, S., Re, F., Fantini, S., Baldini, K., Torricelli, F., Cecchi, F. 2006. A molecular screening strategy based on beta-myosin heavy chain, cardiac myosin binding protein C and troponin T genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med* 7(8):601-7.
- Granzier, H., Wu, Y., Siegfried, L., LeWinter, M. 2005. Titin: physiological function and role in cardiomyopathy and failure. *Heart Fail Rev* 10: 211–223.
- Harada, K., Potter, J.D. 2004. Familial hypertrophic cardiomyopathy mutations from different functional regions of troponin T result in different effects on the pH and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of cardiac muscle contraction. *J Biol Chem* 279:14488–14495.

- Harris, S.P., Bartley, C.R., Hacker, T.A., McDonald, K.S., Douglas, P.S., Greaser, M.L., Powers, P.A., Moss, R.L. 2002. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ Res* 90(5):594-601.
- Heradien, M., Revera, M., Merwe, L., Goosen, A., Corfield, V.A., Brink, P.A., Mayosi, B.M., Moolman-Smook, J.C. 2009. Abnormal blood pressure response to exercise occurs more frequently in hypertrophic cardiomyopathy patients with the R92W troponin T mutation than in those with myosin mutations. *Heart Rhythm* 6(11): S18–S24.
- Hershberger, R.E., Lindenfeld, J., Mestroni, L., Seidman, C. E., Taylor, M.R.G., Towbin, J.A. 2009. Genetic Evaluation of Cardiomyopathy - A Heart Failure Society of America Practice Guideline. *Journal of Cardiac Failure* 15 (2): 83-97.
- Hilfiker-Kleiner, D., Knöll, R. 2008. Disease-Modifying Mutations in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy - Complexity From Simplicity. *Circulation* 117:1775-1777.
- Ho, C. Y. 2011. New paradigms in hypertrophic cardiomyopathy: insights from genetics. *Progress in Pediatric Cardiology* 31: 93-98.
- Ho, C. Y. 2010. Hypertrophy Cardiomyopathy. *Heart Failure Clin* 6: 141–159.
- Ho, C. Y, Seidman, C. 2006. A Contemporary Approach to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 113:e858-e862
- Hoffman, B., Schmidt-Traub, H., Perrot, A., Osterziel, K.J., Gesner, R. 2001. First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Human Mutation* 17(6): 524.
- Ingles, J., Doolan, A., Chiu, C., Seidman, J., Seidman, C., Semsarian, C. 2005. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counseling. *J Med Genet.* 42(10):e59
- Jääskeläinen, P., Miettinen, R., Kärkkäinen, P., Toivonen, L., Laakso, M., Kuusisto, J. 2004. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland: few founder mutations with benign or intermediary phenotypes. *Ann Med.* 36(1):23-32.
- Keller, D., Carrier, L., Schwartz, K. 2002. Genetics of familial cardiomyopathies and arrhythmias. *Swiss Med Wkly* 132: 401-407.
- Kubo, T., Kitaoka, H., Okawa, M., Matsumura, Y., Hitomi, N., Yamasaki, N., Furuno, T., Takata, J., Nishinaga, M., Kimura, A., Doi, Y.L. 2005. Lifelong left ventricular remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac Myosin-binding protein C gene among Japanese. *J Am Coll Cardiol.* 46(9):1737-43.
- Lechin, M., Quiñones, M.A., Omran, A., Hill, R., Yu, Q., Rakowski, H., Wigle, D., Liew, C.C., Sole, M., Roberts, R., Marian, A.J. 1995. Angiotensin-I Converting Enzyme Genotypes and Left Ventricular Hypertrophy in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 92:1808-1812.
- Manual de utilização do Nanodrop - NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual - <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf>
- Marian, A. J. 2002. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol.* 17(3): 242-252.



- Marian, A. J., Senthil, V., Chen, S.N., Lombardi, R. 2006. Antifibrotic effects of antioxidant N-acetylcysteine in a mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy mutation. *J Am Coll Cardiol* 47(4):827-34.
- Marian, A. J. 2010. Update on Hypertrophic Cardiomyopathy. *Texas Heart Institute Journal* 37(3): 322-323
- Markoul, M., Ackerman, M. J., Atkins, D. L., Law, I. H. 2011. Clinical Spectrum in a family with Tropomyosin-mediated hypertrophic cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Pediatr. Cardiol.* 32(2):215-220.
- Maron, B.J. 2002. Hypertrophic Cardiomyopathy - A sistematic review. *Clinical Cardiology* 287:1308-1320.
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A. J., Seidman, C. E., Young, J. B. 2006. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation* 113:1807-1816.
- Maron, B.J. 2010. Contemporary Insights and Strategies for Risk Stratification and Prevention of Sudden Death in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 121:445-456.
- Marques, V. 2010. Desnaturalização de alta resolução aplicada ao diagnóstico genético de MH. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.
- Merwe, L., Cloete, R., Revera, M., Heradien, M., Goosen, A., Corfield, V. A., Brink, P. A., Moolman-Smook, J. C. 2008. Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genet* 124:57–61.
- Michels, M., Soliman, O. I. I., Phefferkorn, J., Hoedemaekers, Y. M., Kofflard, M. J., Dooijes, D., Majoor-Krakauer, D., Cate, F. J. T. 2009. Disease penetrance and risk stratification for sudden cardiac death in asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers. *European Heart Journal* 30:2593–2598.
- Michele, D.E., Gomez, C.A., Hong, K.E., Westfall, M.V., Metzger, J.M. 2002. Cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy mutant tropomyosin mice is transgene-dependent, hypertrophy-independent, and improved by b-blockade. *Circ Res* 91:255–262.
- Millat, G., Chanavat, V., Créhalet, H., Rousson, R. 2010. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 411(23-24):1983-1991.
- Miller, T., Szczesna, D., Housmans, P.R., Zhao, J., Freitas, F., Gomes, A.V., Culbreath, L., McCue, J., Wang, Y., Xu, Y., Kerrick, W.G., Potter, J.D. 2001. Abnormal contractile function in transgenic mice expressing a familial hypertrophic cardiomyopathy-linked troponin T (I79N) mutation. *J Biol Chem* 276:3743–3755.
- Moon, J.C.C., Reed, E., Sheppard, M.N., Elkington, A.G., Ho, S.Y., Burke, M., Petrou, M., Pennell, D.J. 2004. The Histologic Basis of Late Gadolinium Enhancement Cardiovascular Magnetic Resonance in Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 43:2260–4.
- Moolman-Smook, J., De Lange, W., Corfield, V., Brink, P. 2000. Expression of HCM causing mutations: lessons learnt from genotype-phenotype studies of the South African founder MYH7 A797T mutation. *J Med Genet.* 37(12):951-6.

- Morimoto, S. 2008. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular Research* 77:659–666.
- Mörner, S., Richard, P., Kazzam, E., Hellman, U., Hainque, B., Schwartz, K., Waldenström, A. 2003. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J Mol Cell Cardiol.* 35(7):841-9.
- Moss, R.L., Fitzsimons, D.P. 2006. Myosin Light Chain 2 Into the Mainstream of Cardiac Development and Contractility. *Circ Res.* 99:225-227.
- Niimura, H., Patton, K.K., McKenna, W.J., Soultis, J., Maron, B.J., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 2002. Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly. *Circulation* 105:446-451.
- Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C., Kosman, D., del Mistro, G., van den Boom, D., Jurinke, C. 2005. iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. *Sequenom Application Note: 8876-006.*
- Oliva-Sandoval, M. J., Ruiz-Espejo, F., Monserrat, L., Hermida-Prieto, M., Sabater, M., García-Molina, E., Ortiz, M., Rodríguez-García, M. I., Núñez, L., Gimeno, J. R., Castro-Beiras, A., Valdés, M. 2010. Insights into genotype–phenotype correlation in hypertrophic cardiomyopathy. Findings from 18 Spanish families with a single mutation in *MYBPC3*. *Heart* 96:1980-1984.
- Ortiz, M.F., Rodríguez-García, M.I., Hermida-Prieto, M., Fernández, X., Veira, E., Barriales-Villa, R., Castro-Beiras, A., Monserrat, L. 2009. A Homozygous *MYBPC3* Gene Mutation Associated With a Severe Phenotype and a High Risk of Sudden Death in a Family With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol.* 62(5):572-5.
- Orltipp, J. R., Vosberg, H.P., Reith, S., Ohme, F., Mahon, N.G., Schröder, D., Klues, H.G., Hanrath, P., McKenna, W.J. 2002. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart* 87(3):270-5.
- Osio, A., Tan, L., Chen, S.N., Lombardi, R., Nagueh, S.F., Shete, S., Roberts, R., Willerson, J.T., Marian, A.J. 2007. Myozenin 2 Is a Novel Gene for Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 100:766-768.
- Ragoussis, J., Elvidge, G. P., Kaur, K., Colella, S. 2006. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLoS Genet* (2)7: e100.
- Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8(6):597-608.
- Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Benaiche, A., Isnard, R., Dubourg, O., Burban, M., Gueffet, J., Millaire, A., Desnos, M., Schwartz, K., Hainque, B., Komajda, M. 2003. Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. *Circulation* 107:2227-2232.
- Rickers, C., Wilke, N. M., Jerosch-Herold, M., Casey, S. A., Panse, P., Panse, N., Weil, J., Zenovich, A. G., Maron, B. J. 2005 Utility of Cardiac Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 112:855-861.

- Roberts, R., Sigwart, U. 2005. Current Concepts of the Pathogenesis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 112:293-296.
- Roche Diagnostics. Light Cyclor 480 System Gene Scanning Software. Versão 2007. in [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
- Roche Diagnostics. Light Cyclor 480 Real-Time PCR System Technical Note No.1. Versão 2008. in [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
- Rubinshtein, R., Glockner, J. F., Ommen, S. R., Araoz, P. A., Ackerman, M. J., Sorajja, P., Bos, J. M., Tajik, A. J., Valeti, U. S., Nishimura, R. A., Gersh, B. J. 2010. Characteristics and Clinical Significance of Late Gadolinium Enhancement by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 3:51-58.
- Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M., Fernandes, A.R. 2011. Genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting. *Rev Port Cardiol* 30 (01): 7-18.
- Seidman, J.G., Seidman, C. 2001. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104:557-67.
- Sequenom®. iPLEX™ Gold Application Guide. Versão 7 de Dezembro 2007. in [www.sequenom.com](http://www.sequenom.com)
- Sequenom®. 2007. User's Guide Typer 4.0.
- Sequenom®. 2008. MassARRAY® iPLEX® Gold – SNP Genotyping. In [http://www.sequenom.com/getdoc/197b98fa-93f7-40e8-9deb-a8dcfecf899e/iPLEX-brochure\\_web/](http://www.sequenom.com/getdoc/197b98fa-93f7-40e8-9deb-a8dcfecf899e/iPLEX-brochure_web/)
- Shaffer, J.F., Wong, P., Bezold, K.L., Harris, S.P. 2010. Functional differences between the N-terminal domains of mouse and human myosin binding protein-C. *J Biomed Biotechnol* 789-798.
- Spirito, P., Bellone, P., Harris, K.M., Bernabò, P., Bruzzi, P., Maron, B. J. 2000. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 342:1778 –1785.
- Stenson *et al.* 2009. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2008 Update. *Genome Med* 1(1):13. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (acedido em Maio e Junho de 2011)
- Taylor, M.R.G., Carniel, E., Mestroni, L. 2004. Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. *Expert Rev.Mol. Diagn.* 4(1):99-113.
- Taylor, C.F. 2009. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 433–437.
- Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Harada, K., Minakami, R., Shiraishi, F., Ohta, M., Lu, Q.W., Sasaguri, T., Ohtsuki, I. 2001. Functional consequences of the mutations in human cardiac troponin I gene found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33(12): 2095-107.
- Tesson, F., Dufour, C., Moolman, J.C., Carrier, L., al-Mahdawi, S., Chojnowska, L., Dubourg, O., Soubrier, E., Brink, P., Komajda, M., Guicheney, P., Schwartz, K., Feingold, J. 1997. The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation. *J Mol Cell Cardiol.* 29(2):831-8.
- Tindall, E.A., Petersen, D.C., Woodbridge, P., Schipany, K., Hayes, V.M. 2009. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum Mutat* 30:876–883.

- Van der Stoep, N., van Paridon, C.D.M., Janssens, T., Krenkova, P., Stambergova, A., Macek, M., Matthijs, G., Bakker, E. 2009. Diagnostic guidelines for high resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96 well LightScanner™. *Hum Mutat* 30:889–909.
- Van Driest, S.L., Vasile, V.C., Ommen, S.R., Will, M.L., Tajik, A.J., Gersh, B.J., Ackerman, M.J. 2004. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44:1903- 1910.
- Van Driest, S.L., Ommen, S.R., Tajik, A.J., Gersh, B.J., Ackerman, M.J. 2005. Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 80(4):463-469.
- Vossen, R.H.A.M., Aten, E., Roos, A., Dunnen, J.T. 2009. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More Than Just Sequence Variant Screening. *Hum Mutat* 30: 860–866.
- Wang, S.X., Fu, C.Y., Zou, Y.B., Wang, H., Shi, Y., Xu, X.Q., Chen, J.Z., Song, X.D., Huan, T.J., Hui, R.T. 2008. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene associated with magnitude of left ventricular hypertrophy in male patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Chin Med J* 121(1):27-31.
- Watkins, H., Ashrafian, H., Redwood, C. 2011. Inherited Cardiomyopathies. *N Engl J Med* 364:1643-56.
- Wexler, R., Elton, T., Pleister, A., Feldman, D. 2009. Cardiomyopathy: An Overview. *Am Fam Physician*. 79(9): 778–784.
- Wittwer, C.T. 2009. High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. *HUMAN MUTATION* 30(6):857–859.
- Wright, W.T., Heggarty, S.V., Young, I.S., Nicholls, D.P., Whittall, R., Humphries, S.E, Graham, C.A. 2008. Multiplex MassARRAY spectrometry (iPLEX) produces a fast and economical test for 56 familial hypercholesterolaemia-causing mutations. *Clin Genet* 74: 463–468.

## 6- ANEXOS

**Tabela 6.1** – Compilação dos resultados obtidos pelas técnicas de iPLEX *MassArray*, HRM e sequenciação automática.

Amostra	Gene	Exão	Tipo de mutação	Resultado de iPLEX <i>MassArray</i>		Resultado de HRM	Resultado de sequenciação automática
				Alteração nucleotídica	Alteração de tradução	Perfil de desnaturação	
11	<i>TNNT2</i>	14	Mutação pontual	c.779A>G	Lys260Arg	Diferente (+12,1)	Confirma resultado de iPLEX <i>MassArray</i>
21	<i>TNNT2</i>	14	Mutação pontual	c.779A>G	Lys260Arg	Diferente (+12,2)	Confirma resultado de iPLEX <i>MassArray</i>
6	<i>TNNT2</i>	14	Mutação pontual	c.779A>G	Lys260Arg	Diferente (+11,8)	Confirma resultado de iPLEX <i>MassArray</i>
64	<i>TNNT2</i>	14	Mutação pontual	—	—	Diferente (+13,7)	c.779A>G; p.Lys260Arg
25	<i>TNNT2</i>	14	Mutação de <i>splicing</i>	—	—	Diferente (-3,5)	c.801+11A>G – NOVA
241	<i>TNNT2</i>	12	Mutação intrónica	—	—	Diferente (-6,5)	c.600 +65 T>A – NOVA
17	<i>TNNT2</i>	3	Mutação sinónima	—	—	Diferente (+12,8)	c.48G>A; p.Gln16Gln
33	<i>TNNI3</i>	7	Mutação pontual	c.470C>T	Ala157Val	Diferente (-14,8)	Mutação diferente (c.521 A>T; p.Lys174Met) - NOVA
14	<i>MYH7</i>	7	Mutação pontual	—	—	Diferente (+12)	c.611G>A; p.Arg204His
19	<i>MYH7</i>	11	Mutação pontual	c.958G>A	Val320Met	Diferente (+51)	Confirma alteração de iPLEX <i>MassArray</i> , mas em heterozigotia
158	<i>MYH7</i>	13	Mutação pontual	c.1231G>A	Val411Ile	Diferente (-5)	Mutação diferente (c.1252 C>A; p. Gln418Lys)- NOVA
28	<i>MYH7</i>	14	Mutação pontual	c.1354G>A	Arg453His	Diferente (12,6)	Confirma resultado de iPLEX <i>MassArray</i>
16	<i>MYH7</i>	22	Mutação pontual	—	—	Diferente (+14)	c.2585>T; p.Ala862Val
168	<i>MYBPC3</i>	23	Mutação pontual	c.2426G>A	Arg809His	Diferente (-7,5)	Mutação diferente (c.2470C>A; p.Leu824Met) - NOVA
15	<i>MYBPC3</i>	16	Mutação pontual	—	—	Diferente (+13)	c.1727G>A; p.Trp576X – Santos et al, 2011

**HIGH RESOLUTION MELTING: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort**

**Santos S.<sup>(a,b,c)\*</sup>, Marques V.<sup>(b)\*</sup>, Pires, M.<sup>(b)</sup>, Silveira, L.<sup>(b)</sup>, Oliveira, H.<sup>(b)</sup>, Lança V.<sup>(d)</sup>, Brito D.<sup>(e)</sup>, Madeira H.<sup>(e)</sup>, Monteiro, C.<sup>(c)</sup>, Carreira I.M.<sup>(f)</sup>, Gaspar I.M.<sup>(g,h)</sup>, Fernandes A.R.<sup>(a, b, i)</sup>**

\*These authors contributed equally to this work

<sup>a</sup>Centro de Química Estrutural, Instituto Superior técnico, Lisboa, Portugal; <sup>b</sup>Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; <sup>c</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; <sup>d</sup>Centro de Metabolismo e Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal; <sup>e</sup>Centro de Cardiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal; <sup>f</sup>Laboratório de Citogenética, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal; <sup>g</sup>Genética Médica, Hospital Egas Moniz; <sup>h</sup>Cardiogenética, Hospital Santa Cruz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Portugal; <sup>i</sup>Departamento Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Portugal,

Corresponding author: Alexandra R. Fernandes: Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal; +351968078993; +351214844141; [alexandrancrfernandes@gmail.com](mailto:alexandrancrfernandes@gmail.com);

**Abstract**

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM), a complex myocardial disorder with an autosomal dominant genetic pattern has a prevalence of 1:500 and is considered as the most frequent cause of sudden death in young people apparently healthy. The elevated number of genes and mutations involved in this pathology limits HCM gene-based diagnosis that should be considered of most importance for both basic research and clinical medicine. HCM current genetic testing strategy using automated sequencing (AS) is limited due to the high considerable costs plus the time-consuming constraint of this technique. High Resolution Melting (HRM) has demonstrated to be an encouraging new strategy for HCM genetic diagnosis. Our aim was to prove the diagnostic efficacy of HRM technique by analyzing 28 HCM-associated genes, including the most frequent 4 HCM-associated sarcomere genes, as well as 24 genes with lower reported HCM phenotype association. The robustness of this technology was tested by analyzing 80 Portuguese individuals with clinical phenotype of HCM allowing simultaneously a better characterization of this disease in the Portuguese population. HRM technology allowed us to identify 60 mutated alleles in 64 HCM patients: 49 missense mutations, 3 nonsense mutations, one 1-bp deletion, one 5-bp deletion, one in frame 3-bp deletion, one insertion/deletion, three splice mutations, one 5'UTR mutation in *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *CSRP3*, *MYH6* and *MYL2* genes. Significantly 22 of them were novel mutations. In conclusion, HRM was proven to be a high sensitive and low false positive technique allowing, a rapid, innovative and low cost genotyping of HCM patients. In a short return, HRM could be a cost-effective gene-based diagnosis appropriate for

an accurate HCM genetic diagnosis and hopefully providing new insights into genotype/phenotype correlations.

**Keywords:** Hypertrophic cardiomyopathy; Gene-based diagnosis; High Resolution Melting; Sarcomere proteins; *CSRP3* gene; Z-disc proteins